

ROBERTO TADASHI KODAMA

**Análise dos constituintes de baixa massa molecular de quatro venenos do gênero
Bitis e suas atividades biológicas.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo
2015

ROBERTO TADASHI KODAMA

**Análise dos constituintes de baixa massa molecular de quatro venenos do gênero
Bitis e suas atividades biológicas.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Fernanda Portaro

Versão original

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Kodama, Roberto Tadashi.

Análise dos constituintes de baixa massa molecular de quatro venenos do gênero *Bitis* e suas atividades biológicas / Roberto Tadashi Kodama. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Fernanda Calheta Vieira Portaro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Inibidores de peptidases presentes em toxinas animais.

Versão do título para o inglês: Analysis of the low molecular mass constituents from the venom of four species of the *Bitis* genus and biological activities.

1. Enzima conversora de angiotensina I 2. *Bitis* 3. Peptídeo potencializador de bradicinina 4. Hipotensão 5. Peptídeo rico em prolina 6. Veneno I. Portaro, Profa. Dra. Fernanda Calheta Vieira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB068/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Roberto Tadashi Kodama.

Título da Dissertação: Análise dos constituintes de baixa massa molecular de quatro venenos do gênero *Bitis* e suas atividades biológicas.

Orientador(a): Profa. Dra. Fernanda Calheta Vieira Portaro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **070** nas fls. **129** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Thiago dos Santos Moreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Envolvimento dos receptores purinérgicos da região parafacial no controle da quimiossensibilidade central e periférica em ratos não anestesiados*" do qual participam o(s) **Bárbara Falchetto Barna e os pesquisadores Ana Carolina T. Takakura, Vagner R. Antunes**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **08.05.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 09 de maio de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

À minha Mãe, Luiza Keiko Kodama

À minha avó Hatsue Yoshida Kodama

Ao meu avô Tadashi Kodama

Agradecimentos

Agradeço primeiramente às pessoas que estão diretamente ligadas ao projeto e por terem me ajudado em todas as etapas desta fascinante aventura. Meu muito obrigado a minha orientadora, Fernanda Portaro, por me orientar, incentivar e estar sempre disposta a me ensinar sobre todas as questões que surgiram em todos os momentos. Agradeço também ao powerTRIO: Dani Cajado, por sempre estar disposta a ajudar e a tirar minhas dúvidas, ao Bruno, pelas conversas elucidativas e discussões sobre a “literatura da pesada”, e por fim ao meu bom e velho amigo Alexandre Kuniyoshi, que de jeito nenhum eu consigo chamar de Alê nem de zuzu, valeu por tudo Ki você é um cara que eu admiro demais Bro!!

Agradeço à Denise Tambourgi e ao Prof. Wilmar Dias da Silva por me aceitarem no projeto Brasil-África e por terem me dado à oportunidade de trabalhar com os venenos de *Bitis*. Agradeço também todo o pessoal do Laboratório de Imunoquímica. Minha gratidão aos colaboradores do projeto: Eduardo Kitano e Solange Serrano, por fazer as análises no espectrômetro de massa, ao Alexandre Tashima pelas análises no Peaks 7.0 e à Ana Takakura e Bárbara Barna pelos testes *in vivo*.

Thank you Cidão, por além de aguentar o som do meu violino toda os dias, me deixa ler toda a literatura Marvel e DC e talvez saiba de cor todas as minhas apresentações sobre esta tese. Valeu ai galera que sempre esteve ao meu lado desde sempre, todos do Vale Encantando, Ike, Brado, Caião, Alê, Riye, Xola, Pé, Bornes, Rickes, Seiji, Gui, Pri, Helouca e tantos outros. Agradeço também aos grandes mestres que tive durante a vida e que foram de extrema importância na minha formação, Cesar Pellegatti, por ter me ensinado muito sobre música e ter perdido pra mim em todas aquelas partidas de Citadels, ao meu veterano dinossauro Manoel Getulio, à Denise, à Texa e à Maristela. Gostaria de citar uma família que é demais representativa pra mim, a família Machado, valeu ai Sonia, Cida, Nico, Lipe, maLucas, Diana, Nelson e Sirius, sempre um prazer enorme tomar um chá em vossa residência. E agradeço também IceFrog, Arteezy, PhD Garfield e Rocky Balboa, por me proporcionarem entretenimento e incentivo durante esta fase.

Agradeço à Juliana, minha prima querida, que judiava tanto de mim quando criança. à Johilda, que o nome nem o word reconhece como palavra (rs). A tia Marga por sempre ter se importado comigo e ter me incentivado a ler a aprender. A coisa mais fofa do Mundo inteiro, Linda, a cachorra ninja, ao Rambo e Peter. E por ultimo às pessoas que são uma das razões do meu viver, Piu e Isabela, pessoas que estão comigo desde que eu me conheço por gente e que me ensinaram tanta coisa boa da vida.

“Tocar uma nota equivocada é insignificante;
tocar sem paixão é imperdoável”.

Ludwig van Beethoven

RESUMO

KODAMA, R. T. **Análise dos constituintes de baixa massa molecular de quatro venenos do gênero *Bitis* e suas atividades biológicas.** 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Na região da África subsaariana, estima-se que mais de 300.000 acidentes ofídicos ocorram por ano, o que resulta em de cerca de 32.000 mortes, e grande parte das vítimas apresenta lesões locais e incapacidades permanentes. As serpentes do gênero *Bitis* são de extrema importância médica nesta região e suas vítimas apresentam sintomas como dano no local da picada, edema, hemorragia e uma severa hipotensão sendo que em alguns casos, a hipotensão persiste por dias nas vítimas. Este trabalho teve como objetivo a busca de moléculas capazes de inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina I (ECA) na porção de baixa massa molecular do veneno de quatro serpentes do gênero, uma vez que essa enzima é considerada como central na regulação da pressão arterial. Para isto, as porções de baixa massa molecular dos venenos de *Bitis arietans*, *B. gabonica gabonica*, *B. nasicornis* e *B. gabonica rhinoceros* foram fracionadas em RP-HPLC, e cada um dos picos manualmente coletados foram testados em ensaios fluorimétricos utilizando a ECA como enzima e o Abz-FRK(Dnp)P-OH como substrato. Os picos com maior inibição sobre a atividade da ECA foram submetidos a uma análise por espectrometria de massas, resultando em mais de 150 peptídeos obtidos pelo sequenciamento *de novo*. Dentre estes, 34 são oligopeptídeos ricos em prolina (PRO), onde dois já foram descritos no veneno de *Bothrops jararaca* (*Bj*-PRO-10b e *Bj*-PRO-10c). Oito destas sequências foram sintetizadas, sendo os dois peptídeos já conhecidos presentes no veneno de *B. jararaca* e outros seis inéditos na literatura. Com os peptídeos sintetizados, puros e com concentrações conhecidas, foram realizados novos testes de inibição utilizando substratos fluorescentes, e as constantes de inibição (K_i) determinadas para cada uma destas moléculas. A maior parte apresentou um K_i na ordem de 10^{-7} M. Testes em RP-HPLC também foram conduzidos para avaliar o potencial inibitório dos peptídeos frente à hidrólise de substratos naturais da ECA, a angiotensina I (Ang I) e a bradicinina (BK). Quatro dos peptídeos sintéticos demonstraram uma maior inibição da hidrólise de Ang I, sendo que em alguns casos esta inibição foi duas vezes maior do que a inibição da hidrólise de BK. Estes resultados indicam que estes PROs tem preferência para a inibição do sítio C-terminal da ECA, uma vez que a Ang I é preferencialmente hidrolisada por este domínio, enquanto a BK é hidrolisada igualmente pelos sítios C- e N-terminais da enzima. Testes *in vivo* também foram conduzidos e os resultados mostraram que todos os PROs sintetizados reduziram a pressão arterial, e seis destes aumentaram a frequência cardíaca em ratos anestesiados. Embora os PROs sejam moléculas conhecidas em outras serpentes, este trabalho descreve 32 novos peptídeos que podem esclarecer o sintoma de hipotensão apresentado pelas vítimas. Assim, com o exposto, podemos concluir que existem toxinas presentes no veneno de serpentes do gênero *Bitis*, capazes de inibir a atividade da ECA, o que é consistente com os sintomas das vítimas de serpentes do gênero *Bitis*, as quais apresentam uma acentuada e em alguns casos duradoura hipotensão.

Palavras-chave: Enzima conversora de angiotensina I. *Bitis*. Peptídeo potencializador de bradicinina (BPP). Hipotensão. Peptídeo rico em prolina. Veneno.

ABSTRACT

KODAMA, R. T. **Analysis of the low molecular mass constituents from the venom of four species of the *Bitis* genus and biological activities.** 2015, 64 p. Dissertation Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In the sub Saharan Africa approximately 300,000 snakebite accidents are annually registered, which results in around 32,000 deaths and a larger number of victims with permanent local tissue damage and chronic disabilities. Snakes from the *Bitis* genus are considered of extreme medical importance in this region and the victims of *Bitis* envenoming present symptoms such as local tissue damage, edema, spontaneous bleeding and a severe hypotension, in some cases the hypotension persists for days. The objective of this was to seek for molecules that inhibit the activity of the angiotensin I converting enzyme (ACE), since this enzyme has a central role in the regulation of the blood pressure. The low molecular mass portion of the venoms of *Bitis arietans*, *B. gabonica gabonica*, *B. nasicornis* and *B. gabonica rhinoceros* were fractionated in C18-RP-HPLC, each one of the fractions were manually collected and tested through fluorimetric assays using ACE as enzyme and the Abz-FRK(Dnp)P-OH as substrate. The peaks that showed the best inhibition over ACE activity were submitted to a mass spectrometry analyses, resulting in over than 150 peptides obtained by de novo sequencing. Among these 150 peptides, 34 are proline rich oligopeptides (PRO), where two of them were already known (*Bj*-PRO-10b and *Bj*-PRO-10c) both previously characterized in *Bothrops jararaca* venom. Eight of these peptides were synthesized, the two peptides from *B. jararaca* venom and six unpublished. The synthetic peptides with known concentrations were tested in inhibition assays using fluorescent substrates, and the inhibition constants (K_i) were determined for each one of these molecules. Most of them presented a K_i around 10^{-7} M. RP-HPLC tests were conducted to evaluate the inhibitory potential of the synthetic peptides over the hydrolysis of natural substrates of ACE, angiotensin I (Ang I) and bradykinin (BK). Four of the synthetic peptides presented a greater inhibition of the hydrolyses of Ang I, and in one case the inhibition were twice than the hydrolyses of BK. These results indicate that these particular PROs has preference for the inhibition of the C-terminal domain of ACE, since that Ang I is preferably hydrolyzed by this domain, while BK is hydrolyzed equally by both domains C- and N-terminals of the enzyme. *In vivo* tests were also conducted and the results showed that all synthesized PROs were able to decrease the mean arterial pressure and six of them raised the heart rate in the animals tested. Although PROs are known molecules in other snakes, this work describes 32 new peptides that can help to explain the hypotension symptom on the victims. Therefore we can conclude that there are toxins present in the *Bitis* genus capable of inhibit ACE, which is consistent with the symptoms of the victims of *Bitis* envenomation, that present an acute and in some cases persistent hypotension.

Keywords: Angiotensin-converting enzyme (ACE). *Bitis*. Bradykinin-potentiating peptide (BPP). Hypotension. Proline-rich oligopeptide. Venom.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Filograma do Gênero <i>Bitis</i>	18
Figura 2 - Fotos das espécies de <i>Bitis</i> estudadas neste trabalho a) <i>Bitis gabonica</i> ; b) <i>Bitis gabonica rhinocerus</i> ; c) <i>Bitis nasicornis</i> e d) <i>Bitis arietans</i>	19
Figura 3 - Interação entre os sistemas renina-angiotensina e calicreína-cinina mostrando a produção e clivagem da Ang I e BK.....	22
Figura 4 - Perfil cromatográfico dos PPs dos venenos de <i>B. arietans</i> (BA), <i>B. gabonica</i> (BG), <i>B. nasicornis</i> (BN) e <i>B. gabonica rhinocerus</i> (BR). Os picos enquadados foram os selecionados nos ensaios fluorimétricos para a análise de espectrometria de massas.....	33
Figura 5A - Perfil e picos coletados do PP do veneno de <i>B. arietans</i> , a linha azul representa o aumento da concentração da solução B na corrida.....	34
Figura 5B - Perfil e picos coletados do PP do veneno de <i>B. gabonica</i> , a linha azul representa o aumento da concentração da solução B na corrida.....	35
Figura 5C - Perfil e picos coletados do PP do veneno de <i>B. gabonica rhinocerus</i> , a linha azul representa o aumento da concentração da solução B na corrida.....	35
Figura 5D - Perfil e picos coletados do PP do veneno de <i>B. nasicornis</i> , a linha azul representa o aumento da concentração da solução B na corrida.....	36
Figura 6A - Gráfico com as curvas de inibição dos picos do veneno de <i>B. arietans</i> (BA) escolhidos para o sequenciamento (à esquerda); e tabela com a porcentagem de inibição de todos os picos coletados dos PPs do veneno de BA (à direita).....	37
Figura 6B - Gráfico com as curvas de inibição dos picos do veneno de <i>B. gabonica</i> (BG) escolhidos para o sequenciamento (à esquerda); e tabela com a porcentagem de inibição de todos os picos coletados dos PPs do veneno de BG (à direita).....	37
Figura 6C - Gráfico com as curvas de inibição dos picos do veneno de <i>B. gabonica rhinocerus</i> (BR) escolhidos para o sequenciamento (à esquerda); e tabela com a porcentagem de inibição de todos os picos coletados dos PPs do veneno de BG (à direita).....	38
Figura 6D - Gráfico com as curvas de inibição dos picos do veneno de <i>B. nasicornis</i> (BN) escolhidos para o sequenciamento (à esquerda); e tabela com a porcentagem de inibição de todos os picos coletados dos PPs do veneno de BN (à direita).....	38

Figura 7 - Inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA) pelos oligopeptídeos ricos em prolina (PRO) de <i>Bitis</i> spp sobre a hidrólise de angiotensina I (Ang I) e bradicinina (BK).....	43
Figura 8 - Mudanças em (A) pressão arterial (MPA) e (B) frequência cardíaca (FC) induzidas pela injeção i.v. de solução salina ou PROs (15 µg/Kg).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos de acidentes ofídicos por ano.....	17
Tabela 2 - Casos de morte por ano.....	17
Tabela 3 - Sequências, ALC, massa sobre carga (m/z) e cargas dos PROs presentes nos PPs dos venenos de <i>Bitis</i> spp.....	40
Tabela 4 – Constante de Inibição (K_i) dos PROs sintéticos sobre a atividade da ECA utilizando o substrato FRET.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Abreviatura (3 letras)	Abreviatura (1 letra)
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Lista de abreviaturas

Abz	Radical fluorescente ácido <i>orto</i> -aminobenzoico
ACN	Acetonitrila
BA	<i>Bitis arietans</i>
BG	<i>Bitis gabonica</i>
BN	<i>Bitis nasicornis</i>
BR	<i>Bitis gabonica rhinocerus</i>
Dnp	Grupo apagador da fluorescência 2,4-dinitrofenil
ECA	Enzima conversora de angiotensina I
FC	Frequência cardíaca
FRET	“Free Ressonance Energy Transfer”
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
kcat	Constante catalítica
Ki	Constante de Inibição
Km	Constante de Michaelis–Menten
MPA	Média da pressão arterial
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
PBS	Tampão Fostato Salino
PP	Pool peptídico
SVMP	Snake venom metalloproteinase
SVSP	Snake venom serine proteinase
TFA	Ácido trifluoroacético
TRIS	Tris (hidroximetil)-aminometano
UF	Unidade de Fluorescência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Envenenamento e Saúde Pública	17
1.2 O gênero <i>Bitis</i>	18
1.3 O veneno	19
1.4- Sistemas calicreína-cinina e renina-angiotensina	20
1.5 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)	22
1.6 Oligopeptídeos ricos em prolina	23
1.7 Justificativa para o desenvolvimento do presente projeto	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivos gerais	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Venenos e reagentes	27
3.2 Preparação das amostras – obtenção dos Pools Peptídicos (PPs)	27
3.3 Determinação do perfil dos Pools Peptídicos e fracionamento dos venenos em HPLC	27
3.4 Teste de inibição enzimática da ECA pelos picos coletados utilizando o substrato FRET	28
3.5 Espectrometria de massa/stagetip	28
3.6 Síntese dos peptídeos	29
3.7 Determinação das constantes de inibição (K_i) dos PROs sintéticos por fluorimetria	30
3.8 Ensaio de inibição enzimática (ECA) sobre peptídeos biologicamente ativos (Ang I e BK)	30
3.9 Estudos <i>in vivo</i>	31
3.10 Testes estatísticos	32
4 RESULTADOS	33
4.1 Comparação dos perfis dos pools peptídicos dos venenos de <i>Bitis arietans</i>, <i>Bitis gabonica</i>, <i>Bitis nasicornis</i> e <i>Bitis gabonica rhinocerus</i>	33
4.2 Picos coletados dos pools peptídicos de cada um dos venenos estudados	34

4.3 Sequenciamento <i>de novo</i> dos peptídeos dos venenos de <i>Bitis spp</i> com ação inibitória sobre a ECA.....	39
4.4 Inibição da ECA por PROs.....	41
4.4.1 Inibição da atividade da ECA para a hidrólise do substrato FRET....	41
4.4.2 Inibição da atividade da ECA sobre a Angiotensina I e a Bradicininina.....	42
4.5 Efeitos cardiovasculares causados <i>in vivo</i> pela administração via intravenosa de PROs.....	44
5 DISCUSSÃO.....;	46
6 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
APÊNDICE.....	61
A - Lista dos peptídeos encontrados nos pools analisados e suas respectivas massas/cargas, adquiridos pelo sequenciamento <i>de novo</i>.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envenenamento e Saúde Pública

O envenenamento por serpentes representa uma questão de saúde pública para vários países e, apesar da grande dificuldade de se levantar os dados reais desses acidentes, alguns estudos mostram que ocorrem cerca de 5,5 milhões de acidentes, mais de 400.000 amputações e cerca de 20.000 a 125.000 mortes por ano no mundo todo. Estes números superam várias outras doenças tropicais negligenciadas em número de ocorrência e fatalidades, as quais possuem um maior destaque relacionado com problemas de saúde pública, como a leishmaniose, dengue, esquistossomose, cólera e doença de chagas (WILLIAMS et al., 2010). Além disso, o envenenamento ofídico só entrou para esta lista de doenças tropicais negligenciadas em abril de 2009, mostrando que não era visto como uma questão relevante para a saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Na região da África sub saariana, estima-se que mais de 300.000 acidentes ofídicos ocorram por ano, o que resulta numa quantia de cerca de 32.000 mortes, e grande parte das vítimas apresentam lesões locais e incapacidades permanentes. As tabelas abaixo mostram, respectivamente, as estimativas de acidentes e o número de mortes por ano em cada região da África subsaariana (KASTURIRATNE et al., 2008). Grande parte destes acidentes é causada pelo gênero *Bitis*, e dentre as espécies deste gênero, a *B. arietans* é a mais comum, apresentando ampla distribuição na África e causando mais acidentes e mortes em homens e animais domésticos do que todas as outras serpentes africanas juntas (WARREL, 1975).

Tabela 1 - Casos de acidentes ofídicos por ano (adaptado de KASTURIRATNE et al., 2008)

Casos de acidentes ofídicos por ano				
	sub estimativa	razão/100.000	super estimativa	razão/100.000
Região sub saariana, Central	18.176	20,28	47.820	53,37
Região sub saariana, Leste	42.834	12,94	74.823	22,61
Região sub saariana, sul	1.613	2,34	2.296	3,33
Região sub saariana, oeste	27.999	8,87	294.700	93,34

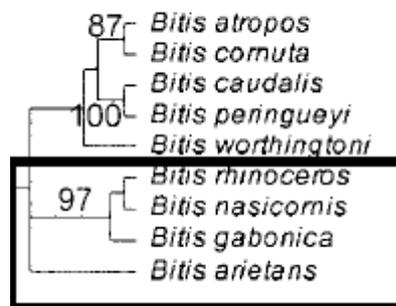
Tabela 2 - Casos de morte por ano (adaptado de KASTURIRATNE et al., 2008)

Casos de morte por ano				
	sub estimativa	razão/ 100.000	super estimativa	razão/100.000
Região sub saariana, Central	256	0,286	3.083	3,441
Região sub saariana, Leste	1397	0,422	10.014	3,026
Região sub saariana, sul	286	0,414	366	0,530
Região sub saariana, oeste	159	0,504	18654	5,909

1.2 O gênero *Bitis*

As espécies do gênero *Bitis*, família Viperidae, subfamília viperinae, apresentam-se distribuídas pela África e Arábia Saudita. Dados moleculares dividiram o gênero em três grupos monofiléticos, o grupo da *B. gabonica*, o grupo da *B. caudalis* e o grupo da *B. cornuta* (**Figura 1**). As espécies *B. arietans* e *B. worthingtoni* não estão incluídas em nenhum destes grupos (**Figura 1**). Este gênero apresenta uma alta distância genética entre as espécies que o compõem (LENK et al., 2001). As espécies *B. gabonica* (**Figura 2a**), *B. g. rhinoceros* (**Figura 2b**), *B. nasicornis* (**Figura 2c**) e a *B. arietans* (**Figura 2d**) apresentam diferenças em seu tamanho, fenótipo e na composição de seu veneno sendo para este último, encontrada em níveis intra e interespecíficos (CALVETE et al., 2007; WHO, 2010).

Figura 1 - Filograma do Gênero *Bitis*



Adaptado de LENK et al., (2001).

Figura 2 - Fotos das espécies de *Bitis* estudadas neste trabalho a) *Bitis gabonica*; b) *Bitis gabonica rhinocerus*; c) *Bitis nasicornis* e d) *Bitis arietans*



Estas serpentes estão presentes em toda a extensão da África sub saariana e *B. arietans* é a espécie de maior distribuição por toda esta região, estando ausente somente na região central, principalmente na República Democrática do Congo. Por outro lado, a espécie *B. gabonica* é encontrada principalmente na África central, sendo a espécie *B. nasicornis* geograficamente simpátrica com *B. gabonica*. Por fim, pode-se dizer que a distribuição de *B. g. rhinocerus* é mais restrita, estando presente somente na costa oeste, principalmente nos países Costa do Marfim, Gana e Serra Leoa (WHO, 2014b).

1.3 O veneno

O envenenamento por *Bitis spp* pode causar graves danos locais (necrose), trombocitopenia, hemorragia, bradicardia e uma severa hipotensão, sendo que no caso da não

administração de soro o envenenamento pode levar a morte (SEGURA et al., 2010; WARREL, 1975).

Apesar da grande importância em saúde pública, pouco se sabe sobre os componentes tóxicos destes venenos, com especial ênfase às moléculas de baixa massa molecular. Estudos de análises proteômicas e genômicas mostraram que os venenos de serpentes do gênero *Bitis* são constituídos de proteínas pertencentes a quatro grandes grupos: metalopeptidases, serinopeptidases, disintegrinas e lectinas do tipo C (CALVETE et al., 2007; CURRIER et al., 2010). Estudos funcionais demonstraram a presença de metalopeptidases com atividade sobre o colágeno e fibrinogênio (CURRIER et al., 2010; JENNINGS et al., 1999), uma serinopeptidase que libera calidina (Lys-bradicinina) a partir do cininogênio de baixa massa molecular (NIKAI et al., 1993) e lectinas que induzem a liberação de cálcio (OHKURA et al., 1996). Com relação aos componentes peptídicos presentes nesses venenos, podemos citar a arietina e a gabonina, purificadas a partir dos venenos das *B. arietans* e *B. gabonica*, respectivamente, e que interferem com a agregação plaquetária (HUANG et al., 1991, 1992).

Uma análise proteômica também demonstrou a presença de peptídeos ricos em prolina (PRO) em venenos de *Bitis gabonica* e *B. gabonica rhinocerus*, porém não foram encontrados nos venenos de *B. nasicornis* e *B. arietans* (CALVETE et al., 2007a, b; FASOLI 2010).

1.4 Sistemas calicreína-cinina e renina-angiotensina

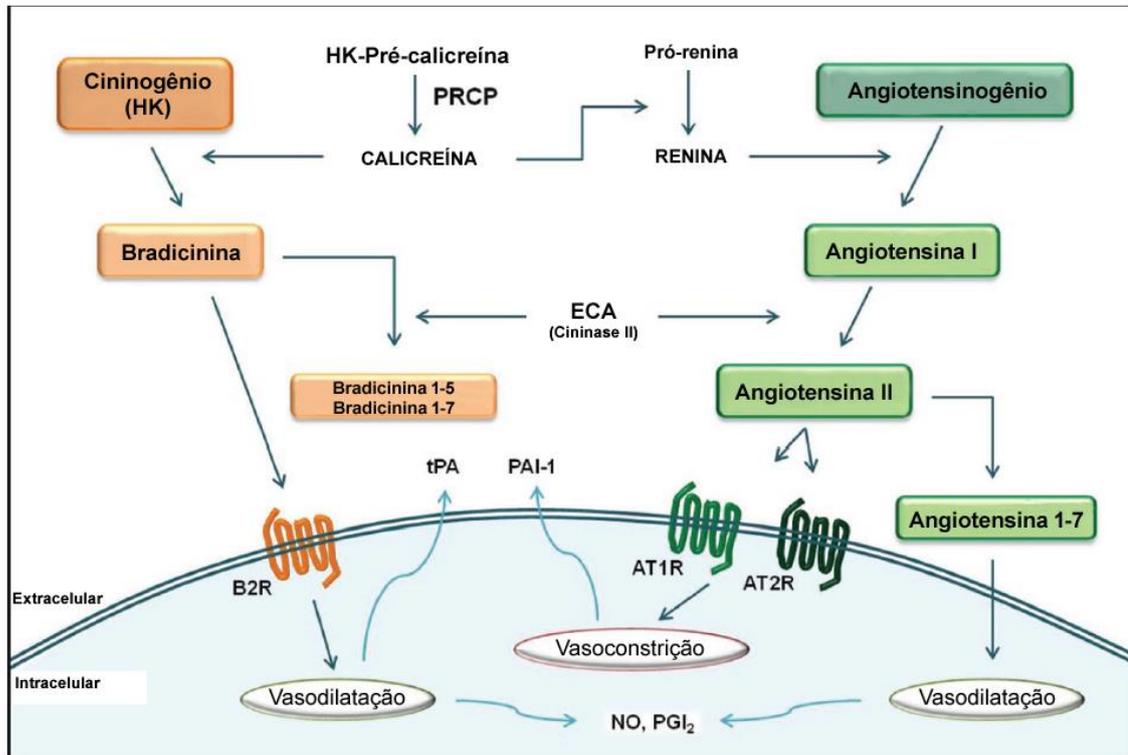
Em 1949, Maurício Rocha e Silva e colaboradores descobriram a bradicinina (BK) enquanto estudavam a fisiopatologia do envenenamento por *Bothrops jararaca*, uma vez que este veneno apresenta em sua composição uma serinopeptidase (KN-Bj) que é capaz de liberar cininas do cininogênio de alto peso molecular (ROCHA E SILVA et al., 1949; SERRANO et al., 1998 revisão). Esta descoberta motivou diversos cientistas a estudarem o papel da BK relacionando à fisiologia e patologia cardiovascular, permitindo a descoberta do sistema calicreína-cinina (SCHMAIER, 2002 revisão). O sistema calicreína-cinina plasmático regula o nível de BK e outras cininas, estas responsáveis também pela regulação da pressão arterial. Assim, é importante mencionar que os estudos com o veneno da *B. jararaca* que tiveram como objetivo o estudo dos efeitos hipotensivos do mesmo, conduzidos por Rocha e Silva e colegas (1949), levaram à compreensão do sistema calicreína-cininas. Estas observações estão entre as mais importantes contribuições de pesquisadores brasileiros para a Ciência mundial.

Outro estudo pioneiro desenvolvido por pesquisadores brasileiros foi conduzido por Ferreira e Rocha e Silva enquanto procuravam inibidores da degradação de BK presentes no veneno da *B. jararaca*. Os autores descreveram a presença de peptídeos no veneno que potencializavam a atividade da BK na contração do músculo liso, sugerindo que houve uma inibição da degradação de BK (FERREIRA; ROCHA E SILVA, 1965). Anos mais tarde, Ferreira e colegas obtiveram a estrutura primária do primeiro BPP descrito, o *Bj*-BPP-5a (<Glu–Lys–Trp–Ala–Pro) (FERREIRA et al., 1970b)

Outro sistema plasmático importante para a regulação da pressão arterial que deve ser citado é o sistema renina-angiotensina que envolve a enzima conversora de angiotensina I e seus substratos naturais, o peptídeo inativo angiotensina I (Ang I) (Asp–Arg–Val–Tyr–Ile–His–Pro–Phe–His–Leu) e a bradicinina (BK). No sistema renina-angiotensina, o angiotensinogênio, uma glicoproteína de 60 kDa que é sintetizada e liberada pelo fígado, esta é clivada pela renina, liberando o peptídeo inativo angiotensina I a partir de sua região N-terminal. A Ang I, por sua vez é convertida em angiotensina II pela ação da ECA, que libera os dois resíduos de aminoácido da porção C-terminal (His–Leu) da Ang I e formando um octapeptídeo denominado angiotensina II (Asp–Arg–Val–Tyr–Ile–His–Pro–Phe) (SKEGGS et al., 1981) . A angiotensina II interage com o seu receptor específico (AT1) que quando ativado promove uma série efeitos fisiológicos, como a vasoconstrição, o aumento da pressão arterial, a secreção de vasopressina, aldosterona, estímulo da sede e retenção renal de sódio (GALLINAT et al ., 2000) . Outro alvo da angiotensina II é o receptor AT2, que tem funções menos conhecidas, porém acredita-se tenha um efeito cardioprotetor (ANAVEKAR; SOLOMON, 2005). Outra enzima atuante neste sistema é a enzima conversora de angiotensina II, uma carboxipeptidase capaz de converter a Ang II em Ang₍₁₋₇₎ pela remoção do residuo Phe na porção C- terminal da Ang II. A Ang₍₁₋₇₎ é um peptídeo vasodilatador que exerce sua função ativando o receptor denominado Mas promovendo um efeito contrário a hipertensão realizada pela Ang II (FERRAARIO; VARAGIG, 2010).

No sistema calicreína-cinina a bradicinina (BK) (Arg–Pro–Pro–Gly–Phe–Ser–Pro–Phe–Arg) é liberada do cininogênio de alta massa molecular pela ação da calicreína plasmática. Esta interage com o receptor B2R, que quando ativado promove um efeito hipotensor (KAPLAN; SILVERBERG, 1987). Por sua vez a BK é rapidamente clivada por diferentes enzimas sendo uma delas a ECA, que libera seus quatro últimos aminoácidos (primeiramente Phe–Arg e, em seguida, Ser-Pro), transformando a BK em um peptídeo inativo.

Figura 3 - Interação entre os sistemas renina-angiotensina e caliceína-cinina mostrando a produção e clivagem da Ang I e BK (CAMARGO et al., 2012)



Adaptado de Camargo et al., (2012)

1.5 Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

A enzima conversora de angiotensina I (ECA, EC 3.4.15.1), também denominada cininase II, dipeptidil carboxipeptidase I, pertence à família M2 do clã MA da metalopeptidases. A ECA é uma zinco metalopeptidase que cliva o dipeptídeo C-terminal da angiotensina I para produzir o potente octapeptídeo vasopressor denominado angiotensina II (SKEGGS et al., 1956) e inativa a bradicina pela remoção de um ou dois dipeptídeos do C-terminal (YANG et al., 1970). Além desses dois principais substratos fisiológicos, que estão envolvidos na regulação da pressão sanguínea e no metabolismo de sais e água (EHLERS; RIORDAN, 1989; SOFFER, 1976), a ECA cliva substratos liberando dipeptídeos C-terminais de vários oligopeptídeos com a carboxila C-terminal livre ou em sua forma amidada, com exceção em casos onde há ausência de um penúltimo resíduo de prolina (BARRET et al., 1998; CHEUNG; CUSHAMN, 1973).

Sabe-se, atualmente, que a ECA apresenta dois sítios catalíticos semelhantes, porém o sítio localizado mais próximo ao C-terminal (WEI et al., 1990) denominado sítio C, é o maior responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II. Ou seja, o sítio C-terminal da ECA apresenta cerca de quatro vezes mais atividade hidrolítica sobre a Ang I do que o sítio N-terminal da enzima. O sítio mais próximo ao N-terminal (denominado sítio N) metaboliza um hormônio-tetrapeptídeo (Ac-Ser-Asp-Lys-Pro-OH) que está envolvido na regulação negativa da hematopoiese (AZIZI et al, 1996; BARRET et al., 1998c; RIEGER et al., 1993; ROUSSEAU et al., 1994). Ainda, é importante mencionar que a bradicinina é inativada igualmente pelos sítios N- e C-terminais (WEI et al., 1990). Assim, o domínio C-terminal tem duas funções: conversão da angiotensina I em angiotensina II e inativação da bradicinina, atividades que ocorrem predominantemente no pulmão, ocasionando hipertensão arterial (NG; VANE, 1967, 1968; RYAN et al., 1968).

A ECA necessita de cloreto para a hidrólise da angiotensina I, contudo, o ânion não é essencial para a atividade catalítica da enzima sobre a bradicinina, que é hidrolisada na ausência de cloreto, por exemplo. A ligação com o cloreto altera a conformação do sítio ativo, facilitando a ligação do substrato com a enzima (ACHARYA et al., 2003 review). A dependência de cloreto é diferente para os dois sítios ativos da ECA. O sítio C- apresenta dependência mais marcante e, portanto, condições diferentes de Cl⁻ e pH podem alterar as atividades relativas dos dois sítios da ECA, bem como a determinação de substratos específicos para cada um deles (BARRET et al., 1998).

1.6 Oligopeptídeos ricos em prolina

Os oligopeptídeos ricos em prolina (PROs), também conhecidos como peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP), presentes no veneno de *Bothrops jararaca* (*Bj*-PROs) foram os primeiros inibidores naturais da enzima conversora de angiotensina I descritos (FERREIRA; ROCHA E SILVA, 1965). Dentre estes, o *Bj*-BPP-5a (<EKWAP) foi a molécula que inspirou o desenho de inibidores de ECA, como por exemplo o captopril (ONDETTI et al., 1977).

Os PROs são considerados os inibidores naturais mais potentes da ECA e, com exceção dos PROs contendo 5 resíduos de aminoácido, todos compartilham três características marcantes: 1) um resíduo de piroglutamil no N-terminal; 2) um grande número de resíduos de prolina em toda a extensão da cadeia peptídica e 3) dois resíduos de prolina

(Pro-Pro) na porção C- terminal. O primeiro PRO descoberto foi o *Bj*-PRO-5a (FERREIRA; ROCHA E SILVA, 1965), e após isso, PROs foram observados em venenos de diversas gêneros de serpentes, como a própria *Bothrops jararaca* (FERREIRA et al., 1998; IANZER et al., 2004), *Agkistrodon* (MURAYAMA et al., 2000), *Bitis* (CALVETE et al., 2007a; FRANCISCHETTI et al., 2004), *Crotalus* (GRAHAM et al., 2005), *Lachesis* (SOARES et al., 2005) e *Naja* (EL-SAADANI; EL-SAYED, 2003). PROs também foram encontrados em venenos de outros animais, como a perereca *Phyllomedusa hypochondrialis* (CONCEIÇÃO et al., 2006) e até em artrópodes como escorpiões (FERREIRA et al., 1993; ZENG et al., 2000) e aranhas (FERREIRA et al., 1996). Mais tarde, Tashima e colaboradores (2012), utilizando a espectrometria de massas, fizeram a análise peptidômica do veneno de três serpentes do gênero *Bothrops*; *B. jararaca*, *B. fonsecai* e *B. cotiara*, evidenciando e identificando a presença de diversas sequências de PROs nestes venenos. Também é sabido que alguns dos PROs se mostraram inibidores mais seletivos para o sítio C-terminal da ECA quando comparado ao sítio N- da enzima (COTTON et al., 2002) e a importância desta seletividade já foi melhor introduzida acima. Finalmente, gostaríamos de esclarecer que a nomenclatura PRO, e não BPP foi utilizada neste trabalho uma vez que algumas sequências ricas em prolinas não apresentam efeito potencializador de bradicinina, mas ainda assim, são bons inibidores da ECA (MORAIS et al., 2013).

1.7 Justificativa para o desenvolvimento do presente projeto

Os venenos animais são formados por uma mistura de toxinas, muitas delas de natureza polipeptídica com uma grande diversidade de ações biológicas. Essas moléculas evoluíram de componentes constitutivos desses animais que passaram por um processo de evolução acelerada e foram selecionadas de acordo com as necessidades de sobrevivência de cada espécie. Alguns trabalhos mostram que essas moléculas encontradas e caracterizadas primeiramente em venenos animais, apresentam fortes similaridades estruturais e funcionais com as moléculas constitutivas das demais espécies animais, incluindo os mamíferos. As sarafotoxinas, por exemplo, são peptídeos encontrados no veneno da serpente *Atractaspis engaddensi* similares às endotelinas humanas, onde ambas compõem uma superfamília formada por 21 peptídeos com alta similaridade estrutural e funcional. Ambas afetam a contração dos músculos cardíaco e liso em vários tecidos de espécies de vertebrados (DUCANCEL et al., 1993).

A ação inibitória de peptídeos sobre peptidases é clássica. As peptidases participam em diversos mecanismos fisiológicos, como a digestão, crescimento, resposta imunológica, reparo tecidual e apoptose (LEUNG et al., 2000). Contudo, um desequilíbrio na atividade proteolítica, seja positivo ou negativo, pode desencadear patologias severas. Por exemplo, sabe-se que em tumores, as metalopeptidases, em especial MMP-2 e MMP-9, atuam na clivagem de componentes da matriz, desencadeando a angiogênese (BAUVOIS, 2012). Outro exemplo é o Captopril, um fármaco inibidor de enzima conversora de angiotensina I (ECA), que age no combate a hipertensão arterial, onde o seu desenvolvimento pela Squibb® teve como base a estrutura primária de um peptídeo descoberto no veneno da *Bothrops jararaca* (ODETTI et al., 1977; SMITH; VANE, 2003). Por conta deste e de outros exemplos, acreditamos ser válida a busca por peptídeos moduladores da atividade peptidásica na fração de baixa massa molecular dos venenos de serpentes do gênero *Bitis*, tanto para um melhor entendimento da fisiopatologia do envenenamento, quanto para o possível desenvolvimento de novas drogas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Com o pressuposto da escassa quantidade de informações sobre os componentes de baixa massa molecular presentes no veneno de serpentes do gênero *Bitis*, o objetivo geral deste trabalho foi estudar os componentes de baixa massa molecular (<10 kDa) do veneno de *B. arietans*, *B. gabonica*, *B. nasicornis* e *B. gabonica rhinoceros* buscando moduladores de enzima conversora de angiotensina I, levando em conta o sintoma de uma severa hipotensão apresentada pelas vítimas do envenenamento.

2.2 Objetivos específicos

- Fracionar os venenos brutos utilizando membranas de corte molecular, obtendo frações de baixas massas moleculares (Pools Peptídicos, PPs);
- Obter frações a partir dos pools peptídicos através do método de cromatografia de fase reversa (HPLC);
- Analisar o potencial inibitório das frações obtidas na etapa de HPLC sobre a enzima conversora de angiotensina I (ECA) em fluorímetro utilizando o substrato FRET Abz-FRK(Dnp)P-OH;
- Determinar a estrutura primária do(s) peptídeo(s) de interesse por espectrometria de massas e sequenciamento *de novo*;
- Sintetizar os peptídeos de interesse, e testar novamente com a ECA;
- Determinar as constantes de inibição (K_i);
- Verificar a diferença de inibição para os diferentes sítios (N e C terminal) da ECA;
- Verificar o efeito hipotensor dos peptídeos sintéticos em testes *in vivo*, usando ratos adultos da linhagem Wistar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Venenos e reagentes

Os venenos de *Bitis* foram adquiridos em sua forma liofilizada da Latoxan SAS (França). Foram adquiridos 10,6 mg de veneno de *Bitis arietans*, 9,6 mg de veneno de *B. gabonica*, 9,4 mg de veneno de *B. nasicornis* e 9,5 mg de veneno de *B. gabonica rhinocerus*.

A enzima conversora de angiotensina I (Angiotensin I Converting Enzyme from rabbit lung), a angiotensina I e a bradicinina foram adquiridos pela Sigma Aldrich.

O Substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Adriana K. Carmona do Departamento de Biofísica da UNIFESP-EPM. Os oito PROs selecionados foram sintetizados pela empresa GenOne (Rio de Janeiro, Brasil).

3.2 Preparação das amostras – obtenção dos Pools Peptídicos (PPs)

Os venenos foram diluídos em 5,0 mL de tampão acetato de amônio 50 mM, pH 4,2. Para obtenção do material peptídico, foram utilizadas membranas de corte molecular de 10 kDa (Amicon Ultra-10 Centrifugal Filter Devices) para todos os venenos, centrifugando a 380 G, a 4 °C por 45 minutos (Eppendorf Centrifuge 5804R). Foram obtidos 4 pools com cerca de 1,0 mL cada.

3.3 Determinação do perfil dos Pools Peptídicos e fracionamento dos venenos em HPLC

O sistema de HPLC utilizado em nosso laboratório é composto por um sistema binário onde existem duas bombas que trabalham com solventes diferentes (solvente A e solvente B, modelos LC 20 AD); um degaseificador, que é um módulo responsável por tirar eventuais bolhas da fase móvel através de vácuo (modelo DGU 20A₃); um detector de UV capaz de medir 2 comprimentos de ondas simultaneamente (modelo SPD 20 A) e um detector de fluorescência que também trabalha com 2 comprimentos de onda: um de excitação e outro de emissão (modelo RF 10 AXL). Também fazem parte do equipamento um injetor automático (SIL 20 AC HT) e um módulo controlador. Trata-se de um Shimadzu Proeminence. Foi utilizada a Coluna C-18 Shim-Pack (150x 4,6 mm).

Após a obtenção dos 4 pools peptídicos (PPs), foram determinados os perfis de todas as amostras em coluna C-18 no HPLC e gradiente de 20% a 60% de solvente B em 20 minutos (1,25% B/min, fluxo 1mL/min, absorvância a 214 nm) e para tal, foram injetados 50 µL. Para a etapa de coleta, foram injetados 150 µL de cada um dos quatro PPs. Todos os picos dos venenos foram coletados manualmente na saída do sistema de HPLC e liofilizados. Posteriormente, os picos foram ressuspensos em 100 µL tampão Tris HCl 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7,0 para os testes de inibição enzimática.

3.4 Teste de inibição enzimática da ECA pelos picos coletados utilizando o substrato FRET

As reações enzimáticas foram realizadas em fluorímetro (Victor 3, Perkin Elmer, MA, USA), utilizando placas de 96 poços, ajustado para leitura de excitação e emissão 320 e 420 nm, respectivamente. A temperatura da reação foi mantida a 37 °C em compartimento termoestabilizado e sob agitação.

Foram realizados testes de atividade inibitória da ECA sobre a hidrólise do substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH. Para tal, 20 µL de cada um dos picos coletados na etapa de HPLC foram incubados com a ECA (50 ng) e o substrato FRET (4 µM) em tampão Tris HCl 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 µM, pH 7,0 durante 15 minutos, com leituras de 1 em 1 minutos. Os testes foram realizados em duplicata. Após a determinação de quais picos provenientes dos PPs das 4 espécies que apresentaram a inibição mais potente da atividade da ECA, os mesmos foram submetidos à análise por espectrometria de massas para a determinação das sequências primárias dos peptídeos de interesse.

3.5 Espectrometria de massa/stagetip

As amostras de peptídeos provenientes do fracionamento dos venenos das 4 espécies que apresentaram maior poder inibitório da ECA foram submetidas a uma etapa de dessalinização utilizando resina C18 a partir do protocolo conhecido como StageTip (Rappsilber et al., 2007). As amostras dessalinizadas foram submetidas ao processo de secagem em *speed-vac* e então as foram dissolvidos em 30 µL de ácido fórmico 0,1% em água MilliQ (fase A) para as análises de LC-MS/MS.

Os peptídeos foram analisados no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (ThermoScientific). Os peptídeos correspondentes às frações coletadas foram

automaticamente carregados em uma pré-coluna C18 Jupiter (Phenomenex; diâmetro dos *beads* 10 μm ; 100 μm x 50 mm) por um sistema de nano HPLC Easy-nLCII (ThermoScientific). Após o processo de *loading* das amostras, os peptídeos foram submetidos à separação cromatográfica em fase reversa utilizando uma coluna C18 AQUA (Phenomenex; diâmetro dos *beads* 5 μm ; 75 μm x 100 mm). Tanto a pré-coluna como a coluna analítica foram confeccionadas no próprio laboratório. Os peptídeos foram eluídos em um gradiente de 5 – 15% de fase B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) em 10 minutos; 15 – 35% B em 30 minutos; 35 – 85% B em 5 minutos; 85% B em 5 minutos; 85 – 5% B em 2 minutos e; 5% B em 8 minutos. Os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos pelo módulo Orbitrap (*scan range*: 400 – 2.000 m/z; resolução do *fullscan*: 30.000; resolução do scan de MS/MS: 7.500). A voltagem do *spray* foi ajustada para +1,8 kV e o instrumento foi operado no modo DDA (*Data Dependent Acquisition*), utilizando um método de fragmentação por HCD (high energy collisionally activated dissociation) dos dez íons mais intensos do espectro de MS para cada *scan* realizado. O tempo de exclusão dinâmica utilizado foi de 90 segundos em intervalos de repetição de 30 segundos. Os espectros de MS e MS/MS submetidos à análise bioinformática utilizando o software Peaks 7.

3.6 Síntese dos peptídeos

Após a determinação das 34 seqüências de PROs presentes nas amostras analisadas por espectrometria de massas, oito deles foram sintetizados e adquiridos através da empresa GenOne.

Resumidamente, os PROs foram sintetizados utilizando a técnica de síntese de peptídeos de fase sólida (SPFS) com o procedimento Fmoc (ATHERTON e SHEPPARD, 1989). Foram realizados acoplamentos sequenciais de aminoácidos protegidos com HOBt (1-Hydroxy- benzotriazole), TBTU (tetrafluorborato de N-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametilurônio), e NMM (N-Methylmorpholine) em resina L-prolina-2-clorotritil. A liberação do Fmoc foi feita com 50% de morfolina (v/v) em DMF. Os peptídeos acoplados à resina foram clivados/desprotegidos com TFA/thioanisole/etanoditiol/fenol/H₂O (82,5/5,0/2,5/5,0 - v/v/v/v) à temperatura ambiente por 4 horas. Depois da filtração, a parte filtrada foi concentrada sob uma corrente de argônio e precipitado com éter dietil. Todos os

peptídeos sintéticos foram purificados por cromatografia de fase reversa, a pureza foi confirmada por RP-HPLC e as seqüências foram confirmadas por espectrometria de massas.

3.7 Determinação das constantes de inibição (K_i) dos PROs sintéticos por fluorimetria

Foram obtidos os K_i s dos oito PROs sintéticos para a inibição da hidrólise do substrato FRET pela ECA. Para a determinação da constante de inibição (K_i) foram utilizadas duas concentrações do substrato fluorescente Abz-FRK(Dnp)P-OH de 4 μ M (1 K_m) e 8 μ M (2 K_m) (ARAÚJO et al., 2000) e quatro concentrações diferentes dos peptídeos sintetizados, sendo um controle (sem peptídeo), 0,4 μ M, 0,8 μ M e 1,2 μ M. Para cada concentração de substrato foi feito um controle (ausência de peptídeo). As amostras foram analisadas em duplicatas e, durante todo o experimento, foi mantido o consumo de substrato inferior a 10% da concentração total. As reações ocorreram como descrito item 3.4, e foram analisadas no software Grafit 5. Os valores das constantes de inibição (K_i) foram determinados através da relação da constante de inibição aparente ($K_{i(app)}$) (NICKLIN; BARRET, 1984), descrita a seguir:

$$K_{i(app)} = \frac{[I]}{\left[\left(\frac{v_0}{v_i}\right) - 1\right]} \text{ e } K_i = \frac{K_{i(app)}}{\left[\frac{K_m}{[S]} + 1\right]} \text{ (inibição competitiva)}$$

Onde; $[I]$ = concentração de inibidor; (v_0/v_i) = velocidades de hidrólise na ausência e presença de inibidor, respectivamente e; $K_m/[S]$ = relação entre o K_m do substrato e sua concentração.

3.8 Ensaio de inibição enzimática (ECA) sobre peptídeos biologicamente ativos (Ang I e BK)

Para o teste de inibição enzimática da ECA para a hidrólise da angiotensina I foram utilizados 3 μ M de cada um dos PROs sintéticos, incubados com ECA (50 ng) e angiotensina I (30 μ M) durante 1 hora a 37 °C, e analisados no sistema HPLC com coluna C-18 (1,6% B/min, fluxo 1,0 mL/min). O sistema de HPLC utilizado está descrito no item 3.3. No teste de inibição enzimática sobre a hidrólise da bradicinina foram utilizados 3 μ M de cada um dos

PROs sintéticos, incubados com ECA (50 ng) e bradicinina (30 μ M) durante 2 horas a 37 °C, e analisados no sistema HPLC com coluna C-18 (1,6% B/min, fluxo 1,0 mL/min). Em ambos os casos o tampão de incubação usado foi Tris 100 mM, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 10 μ M, pH 7,0. Os testes foram feitos em duplicata e analisados usando o teste t de Student.

3.9 Estudos *in vivo*

Os experimentos *in vivo* foram realizados em colaboração com a Prof. Dr. Ana C. Takakura do Departamento de Farmacologia – USP e aprovados pela Comissão de Ética no Uso e Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas ICB – USP. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento, e foram mantidos sob um ciclo de 12 h de luz-escuro. Todos os procedimentos que envolveram animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes para o uso de animais em pesquisa científica.

Para a medição da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC), um dia antes dos experimentos ratos Wistar (250 – 280 g) foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg de peso corpóreo) juntamente com xilazina (7 mg/kg de peso corpóreo), e entubados na aorta abdominal através da artéria femoral, usando um tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50). Ao mesmo tempo, um segundo tubo de polietileno foi inserido na veia femoral para a administração das drogas e dos peptídeos sintéticos. Cateteres arterial e venal foram encapsulados subcutaneamente e expostos no dorso dos animais para permitir que os mesmos se movessem livremente. Para registrar as PA e FC, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão Stathan Gould (P23 Db) acoplado a um pré-amplificador (model ETH-200 Bridge Bio Amplifier), e conectado a um sistema de aquisição de dados (Powerlab 16SP, ADInstruments). Os testes foram feitos um dia após a cirurgia e começaram 30 minutos depois da conexão dos tubos ao transdutor de pressão. Os patamares da MPA e do FC foram registrados por 30 minutos, após este registro a solução salina foi injetada por via intravenosa (n = 43). Dez minutos mais tarde, os animais receberam injeções i.v. com os PROs (15 μ g/kg) e a MPA e FC foram registradas por mais 30 minutos. Cada PRO foi testado em um grupo de animais (n \geq 4).

3.10 Testes estatísticos

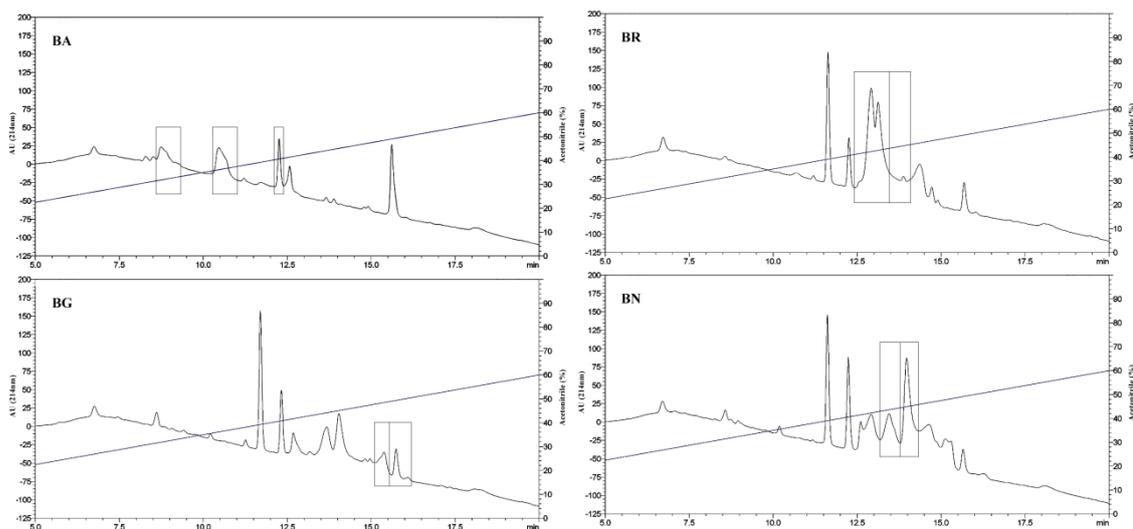
As análises estatísticas foram feitas no Sigma Stat 3.0 (Jandel Corp., Point Richmond, CA, USA). Os dados são mostrados como média \pm DP. O teste pareado de Student e ANOVA one way ou two way paramétrico, seguido por teste múltiplo de Newman-Keuls, foram empregados quando adequado. A significância foi considerada onde $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Comparação dos perfis dos pools peptídicos dos venenos de *Bitis arietans*, *Bitis gabonica*, *Bitis nasicornis* e *Bitis gabonica rhinocerus*.

Após a centrifugação dos venenos utilizando um filtro molecular de 10 kDa, as frações filtradas contendo a porção de baixa massa molecular, chamadas de Pools Peptídicos (PP), foram submetidas a uma cromatografia de fase reversa por HPLC utilizando uma coluna C-18. Foram traçados os perfis de *B. arietans* (BA), *B. gabonica* (BG), *B. nasicornis* (BN) e *B. gabonica rhinocerus* (BR) e estes estão representados na Figura 4.

Figura 4 - Perfil cromatográfico dos PPs dos venenos de *B. arietans* (BA), *B. gabonica* (BG), *B. nasicornis* (BN) e *B. gabonica rhinocerus* (BR). Os picos enquadrados foram os selecionados nos ensaios fluorimétricos para a análise de espectrometria de massas.



Uma vez que todos os venenos liofilizados foram solubilizados e os pools peptídicos obtidos de maneira idêntica, pudemos fazer uma comparação qualitativa entre os perfis. Nota-se que há uma maior similaridade entre os perfis de BG, BN e BR quando comparados com o perfil peptídico do veneno de BA.

Os perfis foram usados como guia para a coleta dos picos de cada PP, sendo coletados manualmente e, posteriormente secos em *Speed vac*. Na Figura 4 pode-se ver a ocorrência de cada pico com tempo de retenção e o gradiente de solução B (representada pela linha azul).

4.2 Picos coletados dos pools peptídicos de cada um dos venenos estudados

A seguir, podemos observar os picos coletados manualmente de cada um dos venenos para posteriores testes fluorimétricos (Figuras 5A, 5B, 5C e 5D).

Figura 5A - Perfil e picos coletados do PP do veneno de *B. arietans*, a linha azul representa o aumento da concentração da solução B na corrida

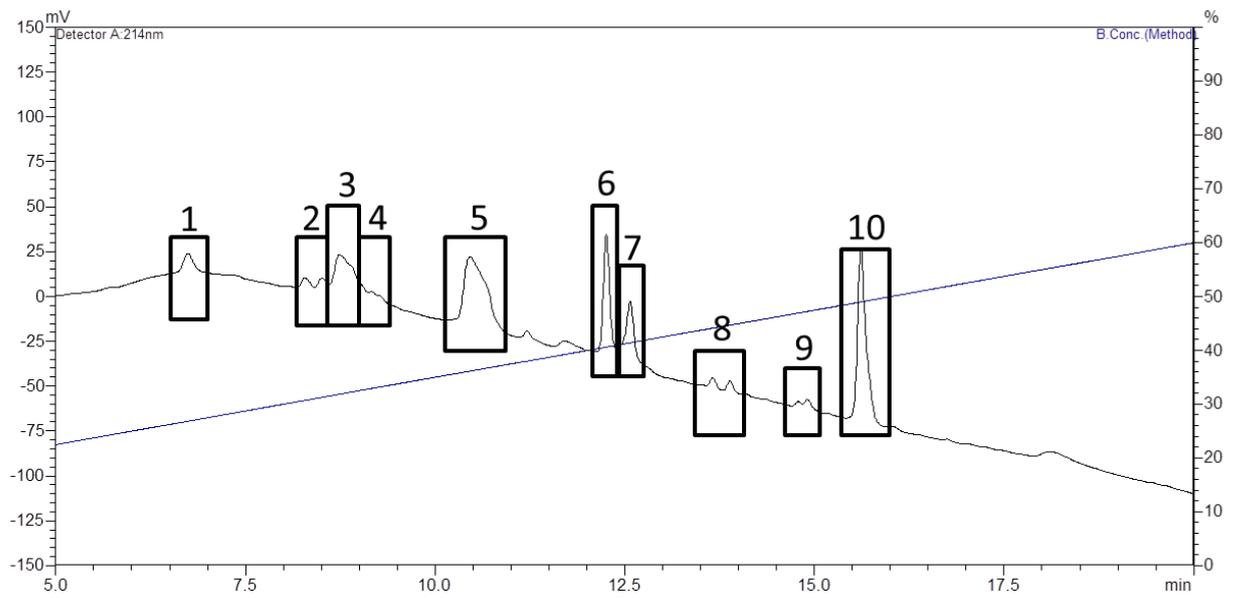


Figura 5B - Perfil e picos coletados do PP do veneno de *B. gabonica*, a linha azul representa o aumento da concentração da solução B na corrida

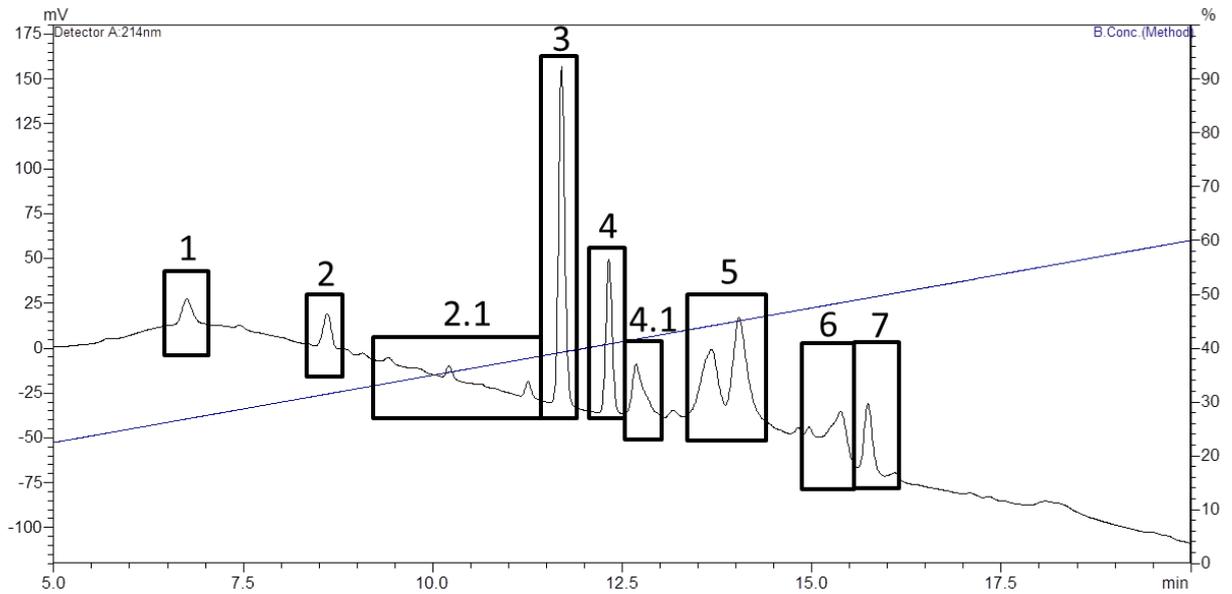


Figura 5C - Perfil e picos coletados do PP do veneno de *B. gabonica rhinocerus*, a linha azul representa o aumento da concentração da solução B na corrida

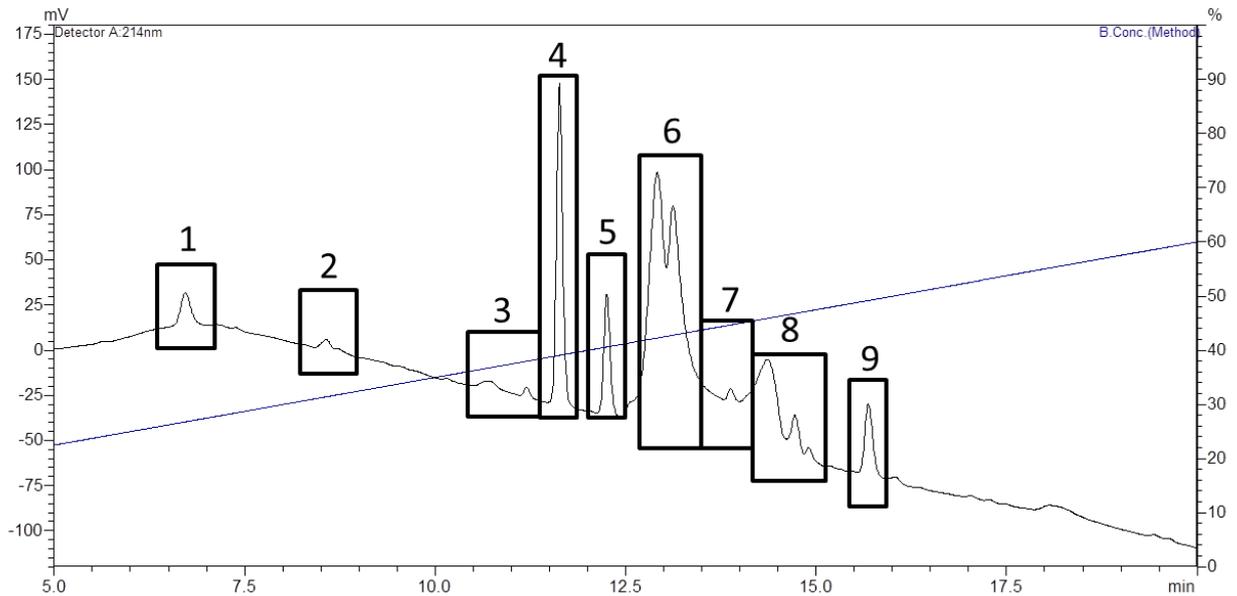
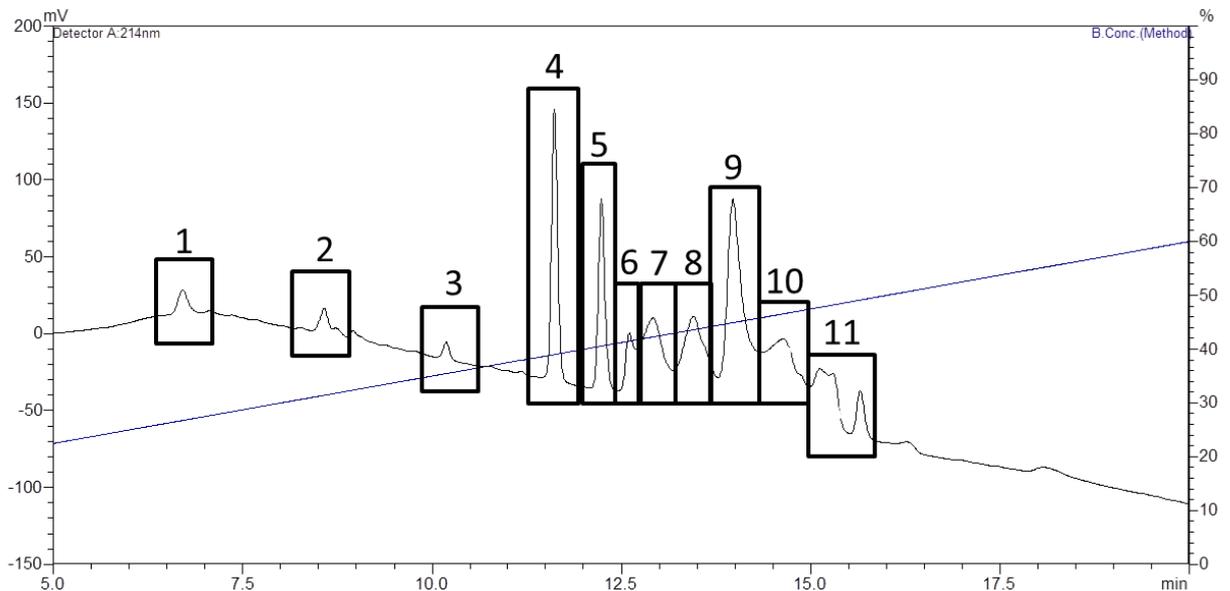


Figura 5D - Perfil e picos coletados do PP do veneno de *B. nasicornis*, a linha azul representa o aumento da concentração da solução B na corrida



Na Figura 5A, onde é mostrado o perfil do PP de *B. arietans*, estão marcados dez picos deste veneno que foram coletadas para os estudos posteriores. Podemos observar a presença de dois picos bem definidos em uma concentração aproximada de 40% de solução B e mais um pico bem definido na concentração de 50% da solução B. Os picos 3, 4 e 5 (picos que apresentaram maior inibição da atividade da ECA, como será mostrado a seguir) se encontram em uma porção menos hidrofóbica, sendo eluídos em uma concentração entre 30 e 40% de solução B. Quando comparamos os perfis dos outros três PPs, de BG, BR e BN (Figuras 4B, 4C e 4D), podemos observar uma maior semelhança entre os mesmos, apresentando picos mais bem definidos em concentrações entre 40 e 45% de solução B, e picos não tão bem definidos no final dos perfis, indicando um arraste durante a eluição da amostra na coluna.

Todos os picos dos PPs das quatro espécies foram coletados e submetidos a um *screening* utilizando o peptídeo FRET Abz-FRK(Dnp)P-OH como substrato e a ECA como enzima. Os picos que apresentaram uma melhor inibição da atividade da ECA neste teste (Figuras 6A, 6B, 6C e 6D) foram submetidos à análise por espectrometria de massas (MS).

Figura 6A - Gráfico com as curvas de inibição dos picos do veneno de *B. arietans* (BA) escolhidos para o sequenciamento (à esquerda); e tabela com a porcentagem de inibição de todos os picos coletados do PP do veneno de BA (à direita)

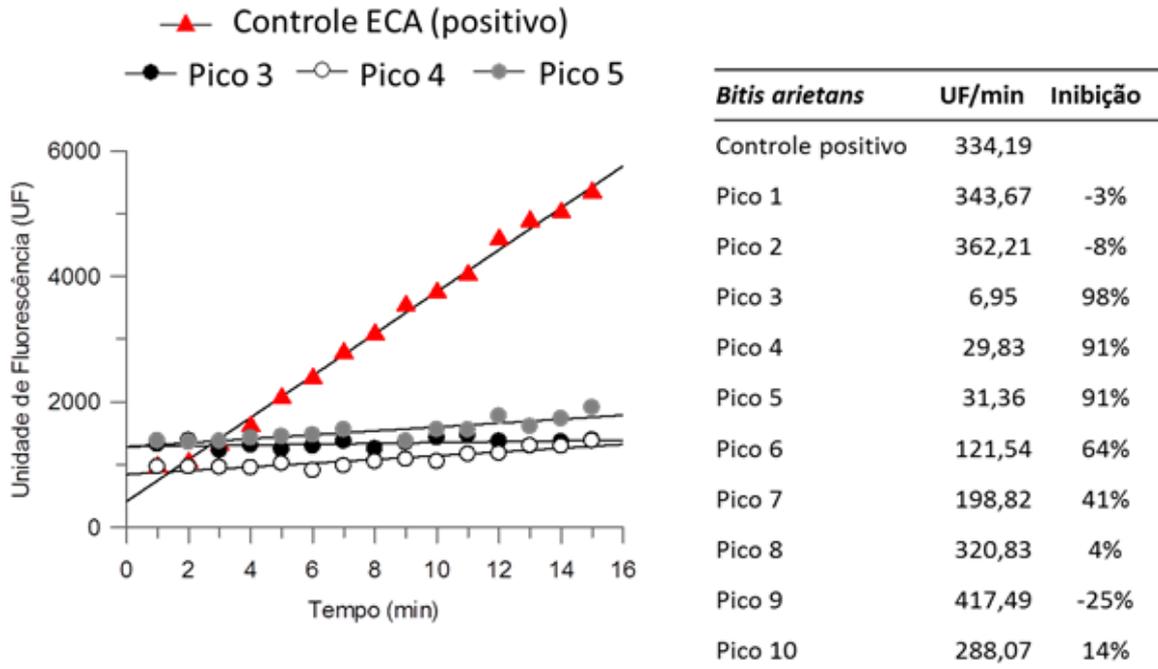


Figura 6B - Gráfico com as curvas de inibição dos picos do veneno de *B. gabonica* (BG) escolhidos para o sequenciamento (à esquerda); e tabela com a porcentagem de inibição de todos os picos coletados do PP do veneno de BG (à direita)

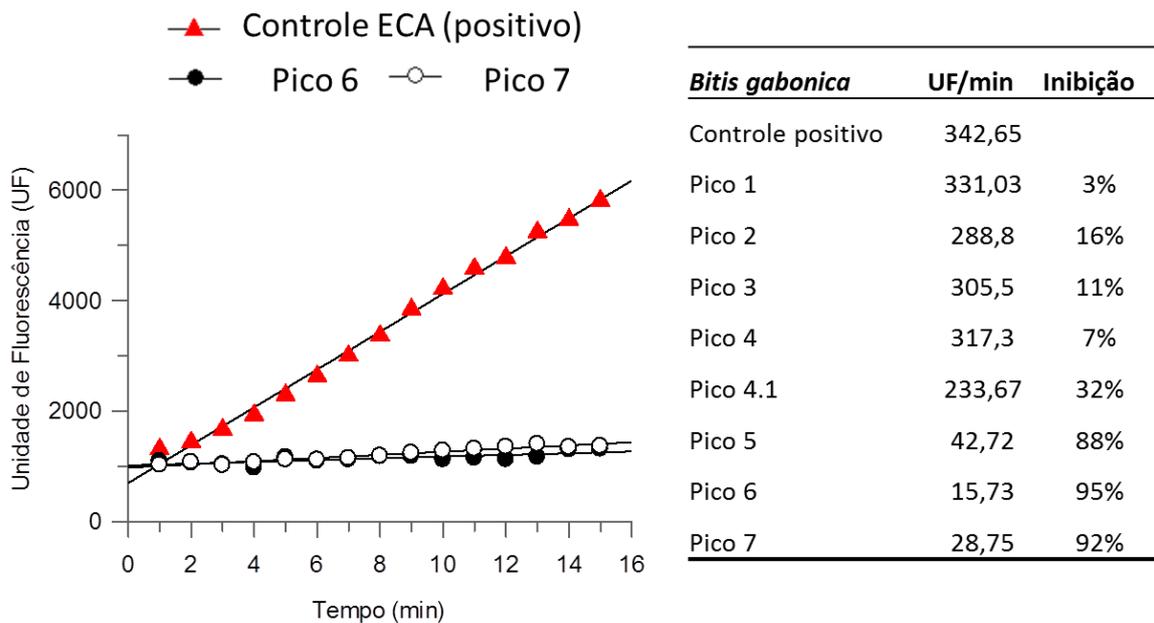


Figura 6C - Gráfico com as curvas de inibição dos picos do veneno de *B. gabonica rhinocerus* (BR) escolhidos para o sequenciamento (à esquerda); e tabela com a porcentagem de inibição de todos os picos coletados do PP do veneno de BG (à direita)

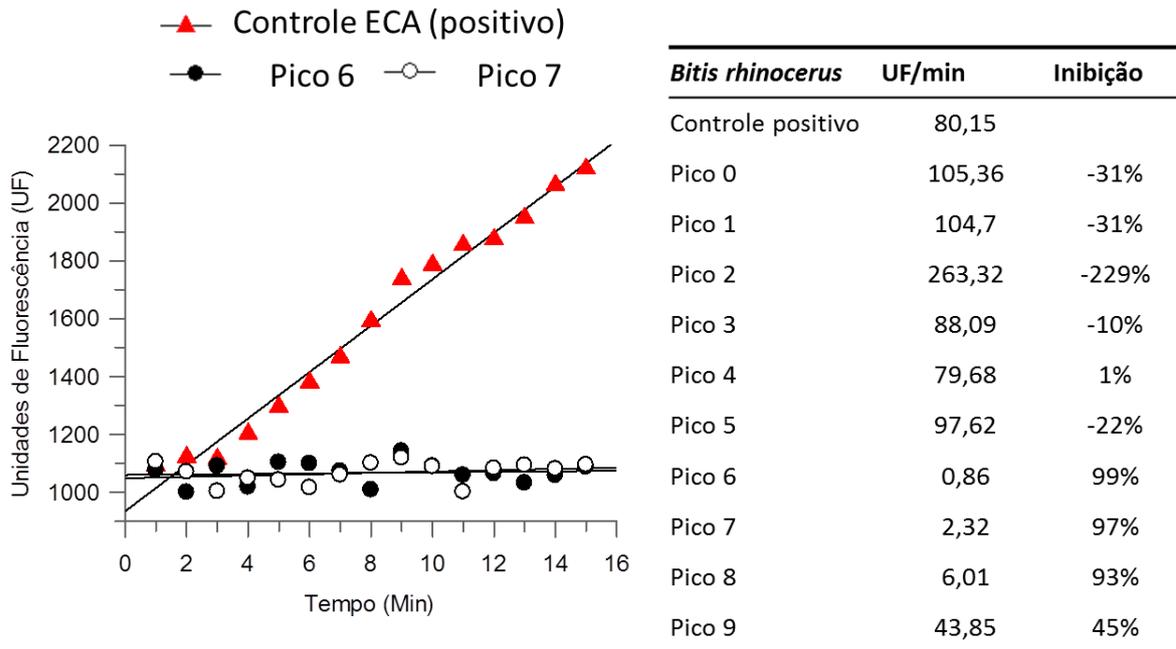
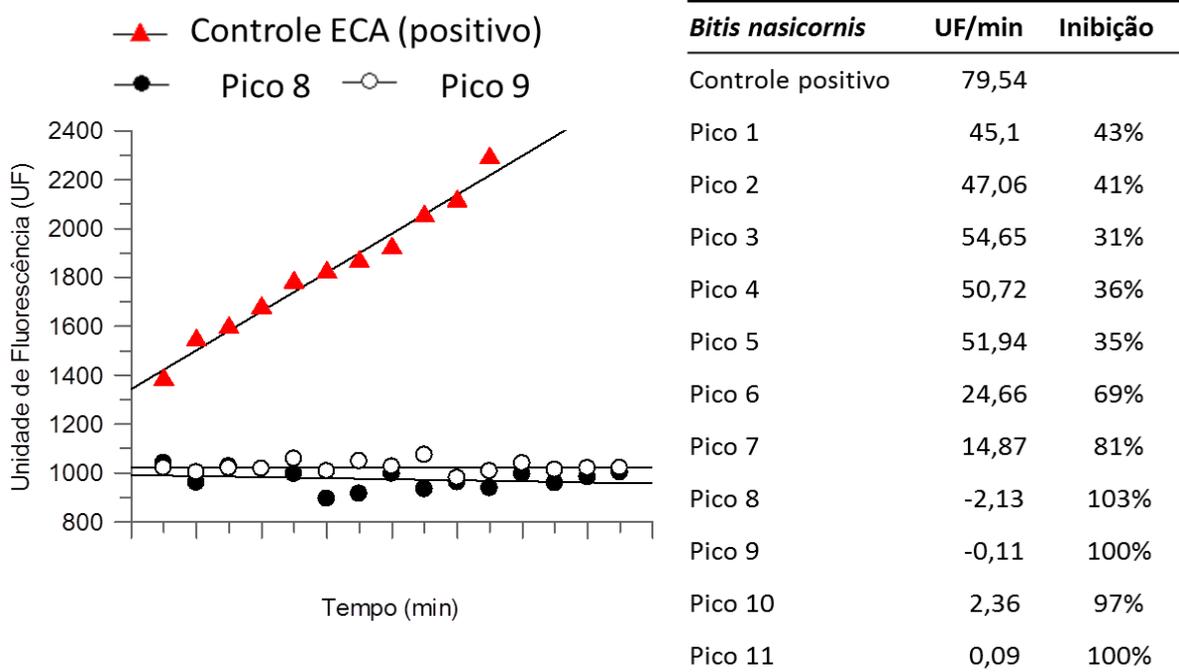


Figura 6D - Gráfico com as curvas de inibição dos picos do veneno de *B. nasicornis* (BN) escolhidos para o sequenciamento (à esquerda); e tabela com a porcentagem de inibição de todos os picos coletados dos PPs do veneno de BN (à direita).



No caso dos PPs de *Bitis gabonica* (picos 6 e 7, Figura 5B) *B. gabonica rhinocerus* (picos 6 e 7, Figura 5C) e *B. nasicornis* (picos 8 e 9, Figura 5D), notamos que os picos coletados com um tempo de retenção maior, ou seja, os mais hidrofóbicos, apresentaram uma maior inibição da ECA no *screening* com o FRET. Por outro lado, no PP de *B. arietans*, os picos que apresentaram uma melhor inibição foram os de número 3, 4 e 5, que são mais hidrofílicos do que os coletados nos outros três venenos, como mostrado da Figura 4A.

4.3 Sequenciamento *de novo* dos peptídeos dos venenos de *Bitis spp* com ação inibitória sobre a ECA

O sequenciamento *de novo* dos espectros de MS/MS dos picos selecionados dos PPs dos venenos das *Bitis* resultaram em mais de 150 sequências (Apêndice 1), com uma média de confiança local (ALC) maior que 75%. Dentre todas as sequências encontradas, 54 delas apresentaram um resíduo de piroglutamil na porção N- terminal, sendo que muitas destas contêm um alto índice de prolina em toda a cadeia peptídica. Ainda no Apêndice 1, podemos ver uma alta incidência de sequências com uma lisina ou arginina como último resíduo de aminoácido na porção C- terminal. E em uma análise do BLASTp de todas as sequências encontradas por espectrometria de massas, foi possível identificar diversas sequências com uma alta similaridade à porções de metalopeptidases já descritas em veneno de *Echis coloratus* (GenBank: ADI47690.1), *Macrovipera lebetina* (UniProtKB/Swiss-Prot: Q4VM08.1), *B. gabonica* (GenBank: AAR25557.1) e *B. arietans* (UniProtKB/Swiss-Prot: P0DM97.1).

Dentre os peptídeos sequenciados, 34 deles apresentaram uma alta similaridade a oligopeptídeos ricos em prolina, tendo duas características principais: um resíduo de piroglutamil na porção N-terminal do peptídeo, e a maioria apresenta o tripeptídeo Ile-Pro-Pro na porção C-terminal. Outra característica que pode ser notada é a alta incidência do resíduo de prolina (Pro, P) na cadeia peptídica. Na Tabela 3, pode-se ver a lista de 34 sequências de PROs, presentes nos diferentes venenos de *Bitis*, contendo de 6 a 12 resíduos de aminoácidos.

Tabela 3 - Sequências, ALC, massa sobre carga (m/z) e cargas dos PROs presentes nos PPs dos venenos de *Bitis* spp.

BA	BG	BR	BN	Sequências	ALC %	m/z	z
		■		<EAMQRGPEIPP	80	652,3245	2
	■			<EAPKPR	98	340,1982	2
	■			<EAPKPRKQ	87	468,2747	2
■				<EHYPAPK	99	412,2083	2
■				<EHYPAPKK	99	317,8400	3
■				<ELSDPPP	94	432,7265	2
■				<ELSDPPR	81	446,7308	2
■				<ELSDPPSRP	80	490,2459	2
	■			<ENWPCPPIPP	87	412,1816	3
	■			<ENWPHPQIPP* ¹	81	598,7964	2
		■		<ENWPHPQVPP*	81	591,7882	2
		■		<ENWPHPQVPPMK	98	721,3547	2
			■	<ENWPRAPGIPPMK	88	737,8838	2
			■	<ENWPRPGAIPP	85	608,3161	2
			■	<ENWPRPK	99	454,7402	2
			■	<ENWPRPKIPP*	82	608,3347	2
			■	<ENWPRPKIPPMK*	96	492,2691	3
			■	<ENWPRPQIPP* ¹	75	608,3175	2
			■	<ENWPRPQIPPMK*	93	492,2572	3
			■	<ENWPRQIPPMK	88	737,8819	2
	■			<ENWQHCEIPP	75	412,1828	3
■				<EQRPPRPQIPP	75	648,8609	2
■				<EQSVPPRP	75	446,2413	2
		■		<ERGPPEIPP	85	487,2583	2
■				<ERPPRP	97	367,2082	2
■				<ERPPRPQIPP	85	584,8328	2
	■			<EWNPHPQIPP	79	598,7962	2
			■	<EWPRPAPGPEIPPMK	99	561,9604	3
		■		<EWQRGPEIPPMK	78	773,8945	2
		■		<EWQRGPEIPP	88	644,3274	2
		■		<EWQRPGEIPMPK	77	516,2654	3
	■			<EWQRPGEIPP*	89	644,327	2
			■	<EWRPPAPGPEIPPM(+15,99)K	92	567,2904	3
			■	<EYWPRP	99	415,2029	2

*sequências selecionadas para a síntese

¹PROs já descritos no veneno da *B. jararaca*

■: Veneno da espécie em que foi encontrada a sequência

Como mostra a Tabela 3, a maioria das sequências são desconhecidas, com a exceção de duas, o peptídeo <ENWPHPQIPP, correspondente ao *Bj*-PRO-10c (ONDETI et al., 1971) e o peptídeo <ENWPRPQIPP, correspondente ao *Bj*-PRO-10b (FERREIRA et al., 1970).

Algumas sequências têm uma alta similaridade com outras moléculas de PROs já conhecidas, como por exemplo o peptídeo <EYWPRP, presente no veneno da *B. nasicosrnis*, que difere do BPP-Vb (<EWPRP, IANZER et al., 2004) pela adição de uma tirosina (Tyr, Y) logo após ao resíduo de <E. Outro exemplo que podemos citar é a sequência <ENWPRPK, encontrada em BN, que apresenta cerca de 90% de similaridade com o Bj-PRO-10e de *Bothrops cotiara*, descrita por Tashima e colaboradores (TASHIMA et al., 2012) e 100% com uma porção do precursor do peptídeo potencializador de bradicinina e o peptídeo natriurético do tipo C (GenBank accessions AFJ49147.1) de *Crotalus adamanteus* (ROKYTA et al., 2012). O PRO <EWQRPGPEIPP foi o único encontrado em duas das espécies estudadas, BG e BR. Algumas sequências de PROs apresentaram similaridades intraespecíficas, <ENWPRPKIPP e <ENWPRPQIPP (ambos de BN), ou interespecíficas <ENWPHPQVPP e <ENWPHPQIPP (BR e BG, respectivamente). Além disso, alguns PROs de BR e BN, incluindo <ENWPRPKIPP e <ENWPRPQIPP foram encontrados em formas estendidas com a presença de uma metionina e uma lisina (MK) logo após as duas prolinas do C-terminal. Estes quatro peptídeos (maduros e estendidos) foram sintetizados com a finalidade de enterdermos melhor a presença dos resíduos MK no C-terminal estendido dos novos PROs.

Diferentemente dos outros PPs, o PP proveniente do veneno de BA apresentou muitas sequências com uma Arg ou uma Lys como último resíduo de aminoácido na porção C-terminal. Apenas duas sequências deste veneno apresentaram a terminação Ile-Pro-Pro no C-terminal, <EQRPPRPQIPP e <ERPPRPQIPP.

4.4 Inibição da ECA por PROs

4.4.1 Inibição da atividade da ECA para a hidrólise do substrato FRET

Para estudar a atividade *in vitro* dos PROs dos venenos de *Bitis*, 8 das 34 moléculas da Tabela 3 foram sintetizados quimicamente. Primeiramente foi testada a possibilidade destes PROs serem susceptíveis à hidrólise pela ECA e, para isso, os PROs foram incubados com a ECA a 37 °C por 4 horas e analisados em HPLC de fase reversa utilizando uma coluna C-18. Todos os peptídeos, incluindo os estendidos, se mantiveram estáveis (dados não mostrados). Foram então feitos experimentos para determinar a constante de inibição (K_i) dos PROs frente a ECA, utilizando o substrato Abz-FRK(Dnp)P-OH (Tabela 4).

Tabela 4 – Constante de Inibição (K_i) dos PROs sintéticos sobre a atividade da ECA utilizando o substrato FRET

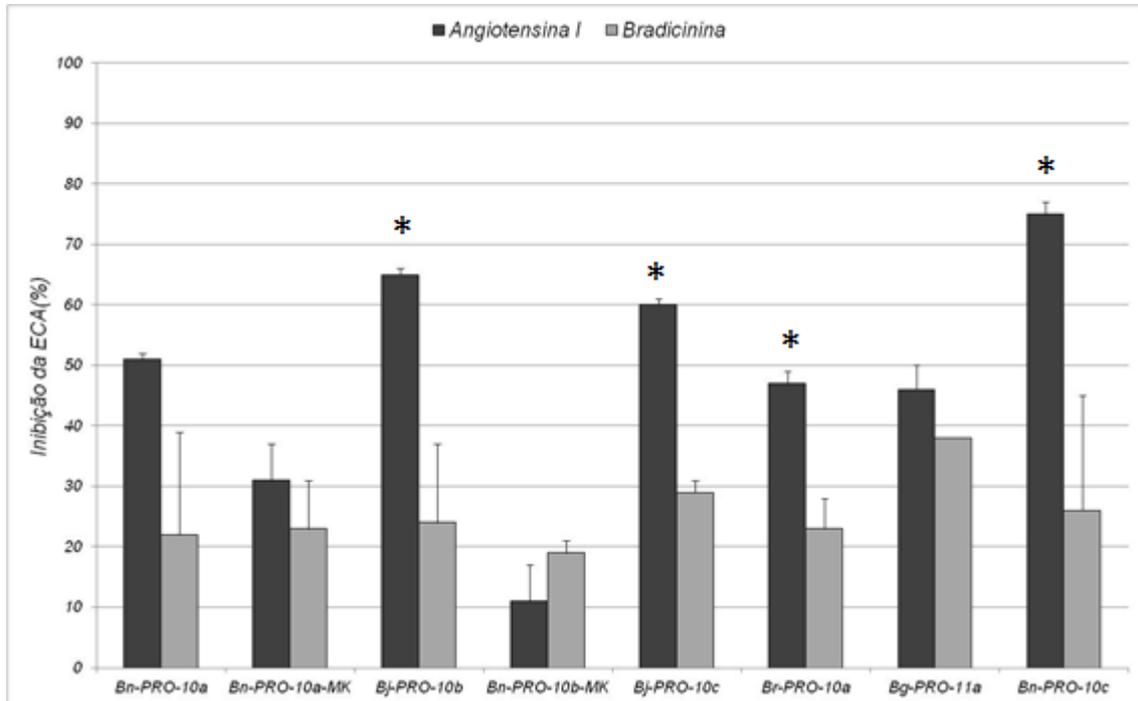
Nome	Sequência	$K_i(\mu\text{M})$
<i>Bn</i> -PRO-10a	<ENWPRPKIPP	0,48
<i>Bn</i> -PRO-10a-MK	<ENWPRPKIPPMK	>100
<i>Bj</i> -PRO-10b	<ENWPRPQIPP	0,28
<i>Bn</i> -PRO-10b-MK	<ENWPRPQIPPMK	>100
<i>Bj</i> -PRO-10c	<ENWPHPQIPP	0,20
<i>Br</i> -PRO-10a	<ENWPHPQVPP	0,83
<i>Bg</i> -PRO-11a	<EWQRPGPEIPP	0,47
<i>Bn</i> -PRO-10c	<ENWPRPKVPP	0,25

Os PROs sintéticos apresentam valores de K_i de 0,20 a 0,83 μM , onde o PRO de BG (também descrito no veneno de *B. jararaca*, *Bj*-PRO-10c) apresenta o melhor K_i (0,20 μM), seguido por dois PROs de BN: *Bn*-PRO-10c e *Bj*-PRO-10b (0,25 μM e 0,28 μM , respectivamente). Os PROs com a extensão Met-Lys pouco inibiram a atividade da ECA, apresentando um K_i acima de 100 μM .

4.4.2 Inibição da atividade da ECA sobre a Angiotensina I e a Bradicینina

Com o intuito de verificar a interação dos oito PROs sintéticos com os domínios C- e N-terminais da ECA, foram conduzidos experimentos de inibição enzimática utilizando Ang I e BK como substratos. A Figura 7 lista todos os PROs que foram capazes de inibir a atividade da ECA sobre os dois substratos em diferentes níveis.

Figura 7 - Inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA) pelos oligopeptídeos ricos em prolina (PRO) de *Bitis* spp sobre a hidrólise de angiotensina I (Ang I) e bradicinina (BK)



A

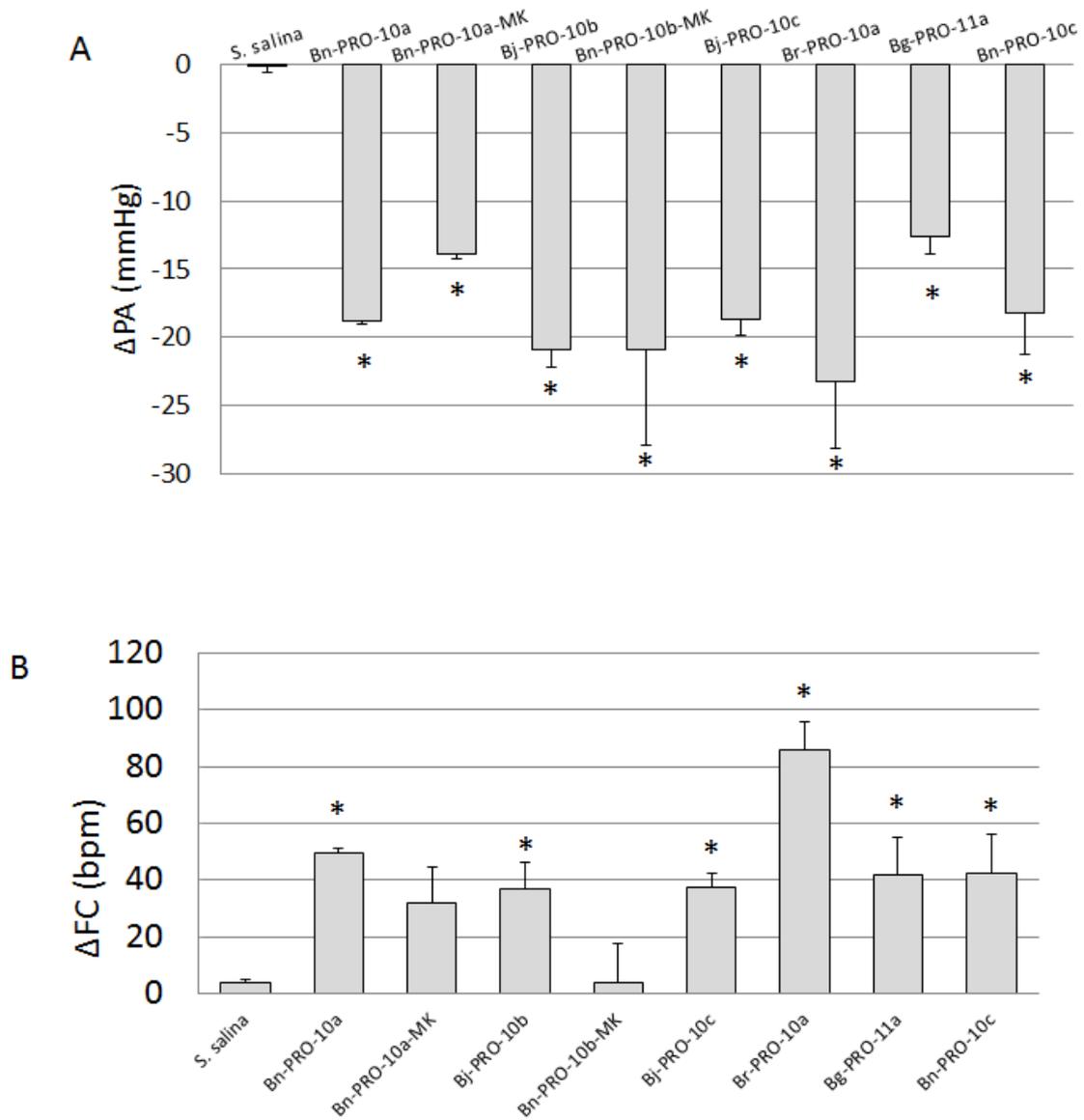
ECA (50 ng) foi incubada com 3 μM de cada PRO por 60 min quando a Ang I (30 μM) foi usada como substrato, e por 120 min com o substrato BK (30 μM) a 37 $^{\circ}\text{C}$. Os resultados estão apresentados em porcentagem de inibição da atividade da ECA e foram obtidos usando uma coluna C-18 em um sistema de RP-HPLC. Os experimentos foram feitos em duplicata. * Diferença significativa, usando o teste t de Student com $P < 0,05$.

Considerando os 8 peptídeos, as inibições da atividade de ECA sobre a BK não variaram muito (19-38%), por outro lado as inibições da ação da ECA sobre a Ang I foram mais expressivas. O peptídeo estendido *Bn-PRO-10b-MK* foi o único em que a inibição da hidrólise da BK foi mais efetiva do que a inibição da hidrólise de Ang I. Os dois peptídeos estendidos *Bn-PRO-10a-MK* e *Bn-PRO-10b-MK*, tiveram a menor inibição relativa quando usados a Ang I e a BK como substratos, em concordância com os resultados observados utilizando o substrato FRET. Os PROs que apresentaram o melhor resultado de inibição da hidrólise da Ang I foram o *Bn-PRO-10c*, *Bj-PRO-10b* e *Bj-PRO-10c* com uma porcentagem de inibição de 74,8%, 64,9% e 60,0%, respectivamente.

4.5 Efeitos cardiovasculares causados *in vivo* pela administração via intravenosa de PROs

Todos os PROs (15 µg/Kg) quando injetados i.v. induziram uma hipotensão imediata e transitória (*Bn*-PRO-10a: -18.8 ± 0.3 , *Bn*-PRO-10a-MK: -13.9 ± 0.4 , *Bj*-PRO-10b: -20.9 ± 1.3 , *Bn*-PRO-10b-MK: -20.9 ± 7.0 , *Bj*-PRO-10c: -18.7 ± 1.2 , *Br*-PRO-10a: -23.3 ± 4.9 , *Br*-PRO-11a: -12.6 ± 1.3 e *Bn*-PRO-10c: -18.2 ± 3.1 mmHg, comparado à solução salina: -0.1 ± 0.5 mmHg) como mostra a Figura 8, utilizando ratos Wistars como modelo animal. Seis dos oito PROs também aumentaram a frequência cardíaca (*Bn*-PRO-10a: 49.6 ± 1.5 , *Bj*-PRO-10b: 37 ± 9.4 , *Bj*-PRO-10c: 37.2 ± 5.2 , *Br*-PRO-10a: 85.6 ± 10.2 , *Br*-PRO-11a: 41.6 ± 13.4 e *Bn*-PRO-10c: 42.5 ± 13.5 bpm, comparado à solução salina: -3.6 ± 1.5 bpm). As duas exceções foram o *Bn*-PRO-10a-MK (31.8 ± 12.8 bpm) e *Bn*-PRO-10b-MK (3.6 ± 13.7 bpm) que não afetaram a FC (Figura 8B). O patamar da MPA e FC foram similares nos oito grupos experimentais, 104.05 ± 3.25 e 366.3 ± 20.47 , respectivamente.

Figura 8 - Mudanças em (A) pressão arterial (MPA) e (B) frequência cardíaca (FC) induzidas pela injeção i.v. de solução salina ou PROs (15 μ g/Kg)



Os resultados estão representados em média \pm DP. N = 4-7 ratos/grupo. * Diferença significativa, usando o teste t de Student com $P < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a espécie que causa o maior número de acidentes na África subsaariana é *Bitis arietans*, enquanto que acidentes com *B. gabonica*, *B. g. rhinocerus* e *B. nasicornis* são menos frequentes. Porém, em todos os casos, os envenenamentos podem levar a óbito ou deixar sequelas permanentes, como amputações do membro atingido (WHO, 2010). Embora ainda haja poucos estudos detalhados sobre o assunto, existem relatos onde é reportada uma frequente e severa hipotensão apresentada pelas vítimas de *Bitis* (HYLSOP; MARSH, 1991; LAVONAS et al., 2002; WARREL et al., 1975). Alguns estudos associaram este sintoma a uma hemorragia extensa no membro atingido (CHAPMAN, 1968), porém, em um estudo feito sobre o envenenamento por *B. arietans* na Nigéria, há descrição de um caso diferenciado. Neste estudo, foram reportados casos de dez pacientes acidentados, onde dois destes chegaram a óbito, sendo que para um deles, o óbito ocorreu uma hora após uma queda abrupta da pressão arterial do paciente mesmo sem a ocorrência de hemorragia intensa (WARREL et al., 1975). Levando em conta o exposto, há a possibilidade de existir uma ação direta do veneno, sendo responsável pela hipotensão apresentada no envenenamento por serpentes do gênero *Bitis*. Para verificar esta questão, este trabalho procurou a presença de moléculas capazes de inibir a atividade da ECA em venenos de quatro espécies deste gênero.

Um dos primeiro passos deste trabalho foi o de traçar o perfil em cromatografia de fase reversa das frações de baixa massa molecular dos venenos das quatro espécies. Pudemos observar uma alta semelhança entre os perfis das frações dos venenos de *B. gabonica*, *B. g. rhinocerus* e *B. nasicornis*. Os três perfis apresentam picos mais bem definidos em uma região mais hidrofílica no cromatograma e que apresentam o mesmo tempo de retenção. Porém, estes picos não mostraram conter moléculas com poder inibitório sobre a ECA. Outra similaridade que pode ser observada entre os perfis destas três espécies de *Bitis* é a presença de picos menos definidos na região hidrofóbica, que contém os peptídeos com poder inibitório sobre a atividade catalítica da ECA. Enquanto isso, o perfil de *B. arietans* mostrou-se diferente em relação aos demais, apresentando os picos mais definidos na região mais hidrofóbica e os picos com ação inibitória sobre a ECA com menores tempos de retenção quando comparados com as outras três espécies. Interessante, esta relação entre os perfis está de acordo com a filogenia destas espécies, em que *B. g. rhinoceros*, *B. nasicornis* e *B. gabonica* são espécies

irmãs, enquanto *B. arietans* é um grupo mais basal e distante filogeneticamente de ambas como apresentado na Figura 1 (LENK et al., 2000).

Após a seleção dos picos dos quatro PPs fracionados em HPLC, aqueles que apresentaram as mais potentes inibições da ECA em ensaio fluorimétrico, acima de 90%, foram enviados para análise de sequências primárias por espectrometria de massas. Os resultados mostraram a presença de mais de mais de 150 sequências, sendo que apenas 34 delas eram relacionadas à PROs. Dentre todos os peptídeos que foram sequenciados *de novo* além dos PROs, podemos observar uma alta incidência de sequências que apresentam um resíduo de piroglutamil no N-terminal das moléculas. Trata-se de uma modificação pós-traducional realizada por uma enzima denominada glutaminil ciclase e nossos resultados sugerem, portanto, a presença desta classe de enzimas nos quatro venenos de *Bitis* analisados (PAWLAK; KINI, 2006; WANG et al., 2014). É interessante ressaltar que os primeiros PROs purificados do veneno de *B. jararaca* falharam em ter suas sequências primárias determinadas pela técnica de degradação de Edman exatamente pela ciclização do resíduo de glutamina no N-terminal destas moléculas. Outra observação que pode ser feita ao analisar as sequências de peptídeos que não se enquadram como PROs é uma quantidade maior de peptídeos, com um ALC acima de 75%, no PP do veneno de *B. arietans*. Dentre estas sequências, muitas apresentam uma lisina ou arginina na porção C-terminal, sendo que algumas destas aparentam ser fragmentos de PROs. Estes peptídeos não apresentam o tripeptídeo IPP no C-terminal, mas contêm muitas prolina em toda a sequência além do resíduo piroglutamil no N-terminal. É importante mencionar que os venenos das quatro espécies foram solubilizados e tratados da mesma forma e a presença de um número maior de sequências truncadas encontradas na análise por espectrometria de massas dos picos do PP do veneno de *B. arietans* nos levou a gerar a hipótese de que existem mais peptidases presentes no veneno de *B. arietans* e estas poderiam clivar os diversos componentes peptídicos e proteolíticos aumentando assim o número de peptídeos presentes nos picos analisados. Foi encontrada em todos os venenos, e não somente no veneno de *B. arietans*, a presença de muitos fragmentos de metalopeptidases.

Além dos peptídeos não relacionados com os PROs, todos os venenos contêm peptídeos com uma alta similaridade a peptídeos hipotensores já conhecidos e descritos no veneno de *Bothrops jararaca*, os Bj-PROs. Os peptídeos descritos no presente trabalho contêm de 6 a 13 aminoácidos, um resíduo de piroglutamil na porção N-terminal do peptídeo e uma alta incidência de resíduos de prolina em toda a extensão da cadeia peptídica, incluindo um dipeptídeo Pro-Pro na porção C-terminal. Algumas exceções também podem ser

observadas, como os peptídeos de 6 a 9 aminoácidos que apresentam ou somente uma prolina na porção C-terminal ou resíduos básicos (Lys ou Arg) <ELSDPPSRP, <EHYPAPKK e <EAPKPR. Dois PROs encontrados, um no veneno de *Bitis nasicornis* (Bj-PRO-10b) e outro em *Bitis gabonica* (Bj-PRO-10c) são idênticos a peptídeos já conhecidos do veneno de *Bothrops jararaca* (FERREIRA et al., 1970; ONDETI et al., 1971). Vale ressaltar que *Bitis* e *Bothrops* são dois gêneros distantes na filogenia de Viperidae, e que a presença destes peptídeos idênticos sugere uma conservação destas moléculas nesta família por cerca de 50 milhões de anos (WÜSTER e al., 2008).

Alguns dos novos PROs de víboras africanas descritos neste trabalho, além de apresentarem duas prolinas na porção C-terminal, também contêm uma extensão após estas duas prolinas formada pelos resíduos Met-Lys. Alguns exemplos destes peptídeos com a extensão Met-Lys são: <EWRPPAPGPEIPPMK, <EQWQRGPEPIPPMK, <EQNWPRQPIPPMK, <EQNWPRPKIPPMK, <EQNWPHPQVPPMK, entre outros. Acreditamos que os vários PROs contendo a mesma extensão referem-se aos precursores proteicos destes peptídeos.

Em estudos anteriores foi descrito o isolamento de cDNAs codificadores para proteínas precursoras de PROs na glândula de veneno (GenBankD85843) e no cérebro de *B. jararaca* (GenBankAF171670) (HAYASHI et al., 2003; MURAYAMA et al., 1997). Estas proteínas contêm sete PROs dispostos em “*tandem*” na porção N-terminal, e uma sequência de um peptídeo natriurético do tipo C (CNP) na porção C-terminal. Ambos os precursores de PROs de *B. jararaca* contêm três cópias únicas e dois pares de sequências repetidas destes peptídeos, todos cercados por uma sequência altamente conservada de seis aminoácidos [L(T/K)VQQWA], com a exceção dos dois pentapeptídeos <EKWAP. Embora haja uma alta similaridade entre as sequências dos PROs nos venenos de *B. jararaca* e *Bitis*, sugerimos que provavelmente haja uma diferença entre as moléculas precursoras de PROs nos venenos de ambos os gêneros, visto que foram encontrados sequências com a extensão MK em alguns dos venenos de *Bitis*, com exceção de BA. Além disso, este dipeptídeo MK não foi encontrado flanqueando nenhuma das sequências nos precursores de PROs já descritos no veneno de *Bothrops jararaca* (HAYASHI et al., 2003) e, também, não foi observado em nenhuma das sequências apresentadas na análise peptidômica do veneno das serpentes *Bothrops jararaca*, *B. cotiara* e *B. fonsecai* (TASHIMA et al., 2012).

No veneno de BA, pela análise de espectrometria de massas, foram encontradas apenas duas sequências de PROs com o dipeptídeo Pro-Pro na porção C-terminal,

<ERPPRPQIPP e <EQRPPRPQIPP. Por outro lado, muitos fragmentos de PROs foram encontrados, alguns deles com um resíduo de Lys ou Arg na porção C- terminal, assim como o observado nas sequências não relacionadas aos PROs. Como já mencionado, todos os venenos estudados foram todos solubilizados na mesma condição, e, portanto, mais uma vez sugerimos a presença de enzimas proteolíticas, capazes de clivar o precursor de PROs em diversas regiões. Tendo por base estes pontos de clivagem, após resíduos de arginina e lisina, é provável que exista a presença de serinopeptidases tripsina-símiles no veneno de *B. arietans* responsáveis pela degradação do PROs.

Observando as sequências primárias de todos os PROs dos venenos das quatro espécies estudadas, pode-se observar uma similaridade entre as serpentes do grupo gabônica (subespécie *Macrocerastes*). Por exemplo, a sequência, <EWQRPGPEIPP, que foi encontrada nos venenos de *B. gabonica* e *B. gabonica rhinocerus*. Estes resultados, novamente estão de acordo com estudos de filogenia baseados nas sequências dos genes do citocromo B mitocondrial (LENK et al., 1999), subunidade NADH, rRNA 16S e 12s (WÜSTER et al., 2008), estudos estes que agruparam as espécies *B. gabonica*, *B. g. rhinocerus* e *B. nasicornis* no subgênero *Macrocerastes*, e isolou *B. arietans* no subgênero *Bitis*.

Dentre todos os PROs sequenciados pela espectrometria de massas, oito deles foram sintetizados e nomeados da seguinte forma *Bn*-PRO-10a (<ENWPRPKIPP), *Bn*-PRO-10a-MK (<ENWPRPKIPPMK), *Bj*-PRO-10b (<ENWPRPQIPP), *Bn*-PRO-10b-MK (<ENPRPQIPPMK), *Bj*-PRO-10c (<ENWPHPQIPP), *Br*-PRO-10a (<ENWPHPQVPP), *Bg*-PRO-11a (<EWQRPGPEIPP) e *Bn*-PRO-10c (<ENWPRPKVPP). O nome deles contém uma abreviatura do organismo de origem formado pelas duas primeiras letras, onde *Bn* indica *B. nasicornis* e *Bj* indica *B. jararaca* por exemplo; seguido da abreviatura para proline rich oligopeptide, PRO, o número de aminoácidos presentes no peptídeo, juntamente com uma letra indicando a ordem cronológica em que o peptídeo com o mesmo número de resíduos de aminoácidos foi descrito. Por fim, alguns apresentam duas letras maiúsculas que representam os resíduos de aminoácidos que compõem a extensão encontrada deste peptídeo. Como já mencionado, dois dos PROs sintetizados são peptídeos já conhecidos e descritos do veneno de *B. jararaca*, o *Bj*-PRO-10b e o *Bj*-PRO-10c, onde foi mantida a nomenclatura original dado em trabalho anterior (LAMEU et al., 2010). O *Bj*-PRO-10c foi sintetizado por também ter sido descrito no veneno de *B. gabonica*, além de poder ser um bom comparativo para nossos resultados, visto que este peptídeo já foi bem estudado (COTTON et al., 2002). O *Bj*-PRO-10b foi escolhido por estar presente no veneno de *B. nasicornis*, mas também por apresentar-

se na forma estendida *Bn*-PRO-10b-MK, e por, apesar de se conhecer a sua sequência em *B. jararaca*, não existem estudos sobre seu potencial inibitório em relação a ECA. Entre *Bn*-PRO-10a e *Bj*-PRO-10b pode-se verificar que a substituição de uma glutamina por uma lisina na posição anterior ao IPP acarretou em uma diferença na inibição da ECA por esses peptídeos, onde *Bj*-PRO-10b apresentou um K_i de 0,28 μM enquanto que o *Bn*-PRO-10a apresentou um K_i de 0,48 μM , quase duas vezes menos eficiente. Além disso, os peptídeos *Bn*-PRO-10a e *Bj*-PRO-10b foram sintetizados em sua forma madura, e estendida, *Bn*-PRO-10a-MK (análogo ao *Bn*-PRO-10a) e *Bn*-PRO-10b-MK (análogo ao *Bj*-PRO-10b), para podermos verificar se a extensão MK influencia na inibição da atividade da ECA. Pudemos observar que os peptídeos com a extensão MK não mostraram uma inibição satisfatória em testes fluorimétricos usando substrato FRET. Vale dizer que nenhum dos peptídeos sintetizados foi hidrolisado pela ECA, incluindo os com a extensão MK.

Em suma, seis dos peptídeos sintetizados são potentes inibidores da ECA, com K_i s variando de 0,20 – 0,83 μM , enquanto que os peptídeos com a extensão MK se apresentaram como fracos inibidores, mesmo quando foi utilizada uma dose mais alta destes peptídeos nos testes. Podemos também concluir que a avaliação da relação entre a sequência primária dos PROs e K_i s obtidos não é clara. Por exemplo, quando foi investigado se um peptídeo contendo Ile-Pro-Pro na porção C-terminal é um inibidor mais eficaz da ECA do que um com Val-Pro-Pro na porção C-terminal pudemos comparar os K_i s de *Bn*-PRO-10a (<ENWPRPKIPP, $K_i = 0,48 \mu\text{M}$) com o *Bn*-PRO-10c (<ENWPRPKVPP, $K_i = 0,25 \mu\text{M}$), e o *Bj*-PRO-10c (<ENWPHPQIPP, $K_i = 0,20 \mu\text{M}$) com o *Br*-PRO-10a (<ENWPHPQVPP, $K_i = 0,83 \mu\text{M}$). Vimos que em um dos casos a presença da valina na posição oito melhorou a inibição da atividade da ECA (*Bn*-PRO-10c comparado com *Bn*-PRO-10a) e em outro caso, quando comparado *Bj*-PRO-10c com *Br*-PRO-10a, a presença da valina nesta posição afetou negativamente o valor do K_i do peptídeo *Br*-PRO-10a. Assim, nossos resultados indicam que a sequência completa do PRO parece ter mais importância para a inibição da ECA do que a substituição de apenas um aminoácido na sequência primária.

Quando comparado os K_i s dos PROs estudados neste projeto com o K_i do captopril ($K_i = 0,046 \mu\text{M}$, ARAUJO et al., 2000), uma molécula muito bem conhecida e de uma alta ação inibitória frente a atividade da ECA, podemos observar que o captopril é cerca de 4 vezes mais potente do que o PRO que apresentou a melhor inibição, o *Bj*-PRO-10c, (K_i de 0,20 μM). Os K_i s para todos os peptídeos sintéticos foram obtidos em um ensaio fluorimétrico, usando um substrato FRET, especialmente desenhado para a ECA, e o os

valores de k_{cat}/K_m para a sua hidrólise usando duas moléculas de ECAs mutantes contendo apenas um sítio intacto (domínio C- ou N-) são de 25,63 ($\mu\text{M}\cdot\text{s}$)⁻¹ e 16,15 ($\mu\text{M}\cdot\text{s}$)⁻¹, respectivamente (ARAÚJO et al., 2000). Como este substrato é clivado por ambos os domínios, mas preferencialmente pelo sítio C-, optamos por realizar experimentos utilizando a angiotensina I e a bradicinina como substratos para a ECA, com o objetivo de investigar a seletividade dos PROs para os dois sítios da ECA.

Os resultados em HPLC indicaram que quatro dos oito peptídeos sintetizados do veneno de *Bitis* são melhores inibidores do sítio C- da ECA, já que inibiram melhor a hidrólise da Ang I. Por outro lado, os peptídeos *Bn*-PRO-10a, *Bn*-PRO-10b-MK, *Bn*-PRO-10a-MK e *Bg*-PRO-11a, que não apresentaram diferença significativa quando comparadas as porcentagens de hidrólises da BK e da Ang I.

É postulado na literatura que um fármaco anti-hipertensivo que fosse um inibidor altamente seletivo para o domínio C- da ECA seria vantajoso, principalmente em dois aspectos: 1) seria inibida a liberação do peptídeo vasopressor Ang II pelo domínio C- da ECA; e 2) a atividade preservada do domínio N- reduziria o aumento nos níveis de bradicinina, uma vez que o acúmulo deste peptídeo pode gerar efeitos colaterais como a angiodema (ANTHONY, 2012). Embora ambas as características estejam presentes em metade dos PROs estudados, é importante dizer que estas toxinas tem uma papel relevante para a predação, causando uma severa hipotensão e facilitando a captura e manejo da presa, independentemente da inibição seletiva de qualquer um dos domínios da ECA.

Nos testes *in vivo* todos os PROs provocaram um efeito no sistema cardiovascular dos ratos. Ou seja, os PROs são capazes de promover redução na média da pressão arterial (MPA) e, ainda, seis deles resultarem em taquicardia nos animais.

Embora uma boa correlação tenha sido obtida com os resultados *in vitro* usando os diferentes substratos (FRET, Ang I e BK), o mesmo não aconteceu com os resultado *in vivo*. A diferença mais significativa se deu quando os dois PROs estendidos foram empregados, embora estes PROs não tenham se mostrado bons inibidores da ECA nos teste *in vitro*, eles promoveram uma significativa redução da média da pressão arterial, especialmente o peptídeo *Bn*-PRO-10b-MK, que foi capaz de reduzir a MPA em nível igual aos resultados dos PROs não estendidos. Duas hipóteses foram elaboradas, uma é de que os peptídeos estendidos podem ter outros alvos *in vivo* promovendo a hipotensão, ao invés de inibir a ECA. Outra hipótese é de que os peptídeos estendidos podem ter sido clivados por enzimas diferentes da ECA e assim foram maturados a suas formas não estendidas e então inibirem a ECA. Outro

fato interessante é de que apenas os PROs estendidos não promoveram uma alteração significativa nas FCs.

Os resultados aqui apresentados descrevem uma classe de peptídeos bioativos, os PROs, que agem contribuindo no quadro de hipotensão e efeitos cardiovasculares causados pelo envenenamento por *Bitis*. Entretanto, não se pode esquecer outras moléculas presentes nestes venenos que podem agir sinergicamente com os PROs, levando as vítimas e presas a um quadro de hipotensão. Por exemplo, sabe-se que o veneno de *B. arietans* contém uma cininogenase liberadora de calidina do cininogênio do plasma (NIKAI et al., 1993), causando vasodilatação, e que esta vasodilatação pode ser altamente potenciada pelo efeito inibitório da ECA pelos PROs. Ainda, é importante dizer que os precursores de PROs descritos até agora apresentam peptídeos natriuréticos na porção N-terminal (McCLEARY; KINI, 2013), peptídeos estes, que também podem promover uma hipotensão (VASELY, 2006). Como os PROs foram selecionados através de um *screening* usando a ECA como enzima, não foi possível identificar os peptídeos natriuréticos do tipo C (CNP). Entretanto, Francischetti e colaboradores (FRANCISCHETTI et al., 2004) descreveram a sequência GLCG (GenBankAY434452), em um estudo de transcriptoma do veneno de *B. gabonica*, sendo estes tetrapeptídeos altamente conservados no precursor de PROs-CNP.

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que existem moléculas de baixa massa nos venenos das *Bitis* estudadas que podem inibir a ação da ECA, a maioria delas inéditas na literatura. Estes peptídeos apresentaram uma significativa constante de inibição *in vitro* e nos testes *in vivo* todos os peptídeos promoveram uma hipotensão.

Com o exposto, podemos concluir que o veneno de *Bitis* contém um arsenal de moléculas capazes de conduzir a vítima a uma severa hipotensão, podendo levar a um choque, como reportado anteriormente (WARREL et al., 1975). Claramente, o estudo da porção de baixa massa molecular do veneno das serpentes deste gênero merece uma atenção especial, tanto na procura de novas moléculas, como no entendimento do envenenamento.

REFERÊNCIAS*

- ANAVEKAR, N. S.; SOLOMON S.D. Angiotensin II receptor blockade and ventricular remodeling. *Journal of Renin Angiotensin Aldosterone System*, v. 6, p. 43–48, 2005.
- ANTHONY, C. S.; MASUYER, G.; STURROCK, E. D.; ACHARYA, K.. R. Structure based drug design of angiotensin-I converting enzyme inhibitors. *Current medicinal chemistry*, v. 19, p. 845-55, 2012.
- ARAUJO, M. C.; MELO, R. L.; CESARI, M. H.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; CARMONA, A. K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry*, v. 39, p. 8519-25, 2000.
- ATHERTON, E.; SHEPPARD, R. C. Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1989. 203 p.
- AZIZI, M.; ROUSSEAU, A.; EZAN, E.; GUYENE, T. T.; MICHELET, S.; GROGNET, J. M.; LENFANT, M.; CORVOL, P.; MÉNARD, J. Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysylproline. *Journal of clinic investigation*, v. 97, n. 3, p. 839–844, 1996.
- BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. Peptidyl-dipeptidase A / angiotensin I converting enzyme. In: BARREET, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. (eds.) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. San Diego: Academic Press, 1998. p. 1066-1076.
- BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1825, p. 29-36, 2012.
- CALVETE, J. J.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake Venomics of Bitis Species Reveals Large Intra-genus Venom Toxin Composition Variation: Application to Taxonomy of Congeneric Taxa. *Journal of proteome research*, v. 6, n. 7, p. 2732-2745 2007(a)
- CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; SANZ, L. Snake venomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2, *Journal of proteome research*, v. 6, n. 1, p. 326-336, 2007(b)
- CAMARGO, A. C. M.; FERNANDES, B. L.; CRUZ, L.; FERRO, E. S. Bioactive Peptides Produced by Limited Proteolysis. Kentucky, Lexington: Morgan & Claypool Life Sciences, 2012. 80 p.
- CHAPMAN, D. The symptomatology, pathology and treatment of the bites of venomous snakes of Central and Southern Africa. *Venomous animals and their venom*, .v. 1, p. 463-527, 1986.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHEUNG, H. S.; CUSHMAN, D. W. Inhibitors of homogenous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 293, p. 451-463, 1973.

CONCEICAO, K.; KONNO, K.; MELO, R. L.; ANTONIZZI, M. M.; JARED, C.; SCIANI, J. M.; CONCEICAO, I. M.; PREZOTO, B. C.; CAMARGO, A. C. M.; PIMENTA, D. C. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*, *Peptides*, v. 28, n. 3, p. 515–523, 2007.

COTTON, J.; HAYASHI, M. A. F.; CUNIASSE, P.; VAZEUX, G.; IANZER, D.; CAMARGO, A. C. M.; DIVE, V. Selective Inhibition of the C-Domain of Angiotensin I Converting Enzyme by Bradykinin Potentiating Peptides. *Biochemistry*, v. 41, p. 6065-6071, 2002.

CURRIER, R. B.; HARRISON, R. A.; ROWLEY, P. D.; LAING, G. D.; WAGSTAFF, S. C. Intra-specific variation in venom of the African Puff Adder (*Bitis arietans*): Differential expression and activity of snake venom metalloproteinases (SVMPs). *Toxicon*, v. 55, n. 4, p. 864-873, 2010.

DEDDISH, P. A.; MARCIC, B.; JACKMAN, H. L.; WANG, H. Z.; SKIDGEL, R. A.; ERDÖS, E. G. N domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension*, v. 31, p. 912–917, 1998.

DUCANCEL, F.; MATRE, V.; DUPONT, C.; LAJEUNESSE, E.; WOLLBERG, Z.; BDOLAH, A.; KOCHVA E.; BOULAIN, J. C.; MÉNEZ, A. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding precursors of sarafotoxins. Evidence for an unusual "rosary-type" organization. *The Journal of Biological Chemistry*, v.268, n. 5, p. 3052-3055, 1993.

EHLERS, M. R. W.; RIORDAN, J. F. Angiotensin-converting enzyme: new concepts concerning its biological role. *Biochemistry*, v. 28, p. 5311-5318, 1989.

EL-SAADANI, M. A.; EL-SAYED, M. F. A bradykinin potentiating peptide from Egyptian cobra venom strongly affects rat atrium contractile force and cellular calcium regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Toxicology and Pharmacology*, v. 136, n. 4, p. 387–395, 2003.

FASOLI, E.; SANZ, L.; WAGSTAFF, S. HARRISON R.A., RIGHETTI P.G., CALVETE J.J. Exploring the venom proteome of the African puff adder, *Bitis arietans*, using a combinatorial peptide library approach at different pHs. *Journal of Proteomics*, v. 73, n. 5, p. 932-942, 2010.

FERRARIO, C. M.; VARAGIG, J. The Ang-(1-7)/ACE2/mas axis in the regulation of nephron function. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, v. 298, p. 297–305, 2013.

FERREIRA, L. A.; ALVEZ, E. W.; HENRIQUES, O. B. Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from *Tityus serrulatus* scorpion venom, *Toxicon*, v. 31, n.8, p. 941–947, 1993.

FERREIRA, L. A.; ALVES, W. E.; LUCAS, M. S.; HABERMEHL, G. G. Isolation and characterization of a bradykinin potentiating peptide (BPP-S) isolated from *Scaptocosa raptorica* venom. *Toxicon*, v. 34, n. 5, p. 599–603, 1996.

FERREIRA, L. A.; GALLE, A.; RAIDA, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; HABERMEHL, G. Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. *Journal of Protein Chemistry*, v. 17 n. 3, p. 285–289, 1998.

FERREIRA, S. H.; BARTELD, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*, v. 9, p. 2583–2593, 1970(b)

FERREIRA, S. H.; GREENE, L. H.; ALABASTER, V. A.; BAKHLE, Y. S.; VANE, J. R. Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. *Natur.*, v. 225, p. 379–380. 1970(a)

FERREIRA, S. H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin-potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia*, v. 15, p. 347–349, 1965.

FRANCISCHETTI, I. M.; MY-PHAM, V.; HARRISON, J.; GARFIELD, M. K.; RIBEIRO, J. M. *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. *Gene*, v. 337, p. 55–69, 2004.

GOMES, C. L.; KONNO, K.; CONCEICAO, I. M.; IANZER, D.; YAMANOUYE, N.; PREZOTO, B. C.; ASSAKURA, M. T.; RADIS-BAPTISTA, G.; YAMANE, T.; SANTOS, R. A.; CAMARGO, A. C. M.; HAYASHI, M. A. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. *Biochemical Pharmacology*, v. 74, n. 9, p. 1350–1360, 2007.

GRAHAM, R. L.; GRAHAM, C.; McCLEAN, S.; CHEN, T.; O'ROURKE, M.; HIRST, D.; THEAKSTON, D.; SHAW, C. Identification and functional analysis of a novel bradykinin inhibitory peptide in the venoms of NewWorld Crotalinae pit vipers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 338, n. 3, p. 1587–1592, 2005.

HAYASHI, M. A.; CAMARGO, A. C. The bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon*, v. 45, p. 1163–1170, 2005.

HAYASHI, M. A.; MURBACH, A. F.; IANZER, D.; PORTARO, F. C. V.; PREZOTO, B. C.; FERNANDES, B. L.; SILVEIRA, P. F.; SILVA, C. A.; PIRES, R. S.; BRITTO, L. R.; DIVE, V.; CAMARGO, A. C. M. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme. *Journal of neurochemistry*, v. 85, p. 969-977, 2003.

HUANG, T. F.; PENG, H. C.; PENG, I. S.; TENG, C. M.; OUYANG, C. An antiplatelet peptide, gabonin, from *Bitis gabonica* snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 298, n. 1, p. 13-20, 1992.

- HUANG, T. F.; WANG, W. J.; TENG, C. M.; OUYANG, C. Mechanism of action of the antiplatelet peptide, arietin, from *Bitis arietans* venom. *Biochimistry and Biophysics Acta*, v. 1074, n. 1, p. 144-150, 1991.
- HYLSOP, S.; MARSH, N. A. Comparison of the physiological effects in rabbits of gaboon viper (*Bitis gabonica*) venoms from different sources. *Toxicon*, v. 29, p. 1235-1250, 1991.
- IANZER, D.; KONNO, K.; MARQUES-PORTO, R.; PORTARO, F. C. V.; STOCKLIN, R.; CAMARGO A.C.M.; PIMENTA, D. C. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides*, v. 25, n. 7, p. 1085-1092, 2004.
- JENNINGS, B. R.; SPEAMAN C. W.; KIRSCH R. E.; SHEPHARD, E. G. A novel high molecular weight fibrinogenase from the venom of *Bitis arietans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1427, n.1, p. 82-91, 1999.
- KAPLAN, A. P.; SILVERBERG, M. The coagulation-kinin pathway of human plasma. *Blood*, v. 70, p. 1-15, 1987
- GALLINAT, S.; BUSCHE, S.; RAIZADA, M. K.; SUMNERS, C. The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *American Journal Physiology Endocrinology and Metabolism*, v. 278, p. 357-374, 2000.
- KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMEWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLO, D.G.; JANAKA DE SILVA, H. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Medicine*, v. 5 n. 11 p. 218, 2008.
- LAMEU, C.; HAYASHI, M. A.; GUERREIRO, J. R.; OLIVEIRA, E. F.; LEBRUN, I.; PONTIERI, V.; MORAIS, K. L.; CAMARGO, A. C. M.; ULRICH, H. The central nervous system as target for antihypertensive actions of a proline-rich peptide from *Bothrops jararaca* venom. *Cytometry Part A*, v. 77, p. 220-230, 2010.
- LAVONAS, E. J.; TOMASZEWSKI, C. A.; FORD, M. D.; ROUSE, A. M.; KERNS, W. P. Severe puff adder (*Bitis arietans*) envenomation with coagulopathy. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, v. 40, p. 911-918, 2002.
- LENK, P.; HERMANN, H. W.; JOGER, U.; WINK, M. Phylogeny and taxonomic subdivision of *Bitis* (Reptilia: Viperidae) based on molecular evidence. *Kaupia*, v. 8, p. 31-38, 1999.
- LENK, P.; KALYABINA, S.; WINK, M.; JOGER, U. Evolutionary relationships among the True Vipers (Reptilia: Viperidae) Inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 19, p. 94-104, 2000.
- LEUNG, D.; ABBENANTE, G.; FAIRLIE, D. P. Protease inhibitors: current status and future prospects. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 3, p. 305-341, 2000.
- MASUYER, G.; SCHWAGER, S. L.; STURROCK, E. D.; ISAAC, R. E.; ACHARYA, K. R. Molecular recognition and regulation of human angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity by natural inhibitory peptides. *Scientific Reports*, v. 2, n. 717, p. 1-10, 2012.

MCCLEARY, R. J.; KINI, R. M. Non-enzymatic proteins from snake venoms: a gold mine of pharmacological tools and drug leads. *Toxicon*, v. 62, p. 56-74, 2013.

MENIN, L.; PERCHUAE, A.; FARVREAU, P.; PERRET, F.; MICHALET, S.; SCHÖNI, R.; WILMER, M.; STÖCKLIN, R. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicon*, v. 51, n. 7, p. 1288–1302, 2008.

MOREAU, M. E.; DUBREUIL, P.; MOLINARO, G.; CHAGNON, M.; MÜLLER-ESTERL, W.; LEPAGE, Y.; MARCEAU, F.; ADAM, A. Expression of metallopeptidases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissues: effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 315, n. 3, p. 1065-1074, 2005.

MURAYAMA, N.; HAYASHI, M. A.; OHI, H.; FERREIRA, L. A.; HERMAN, V. V.; SAITO, H.; FUJITA, Y.; HIGUCHI, S.; FERNANDES, B. L.; YAMANE, T.; CAMARGO, A. C. M. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, p. 1189-1193, 1997.

MURAYAMA, N.; MICHEL, G. H.; YANOSHITA, R.; SAMEJIMA, Y.; SAGUCHI, K.; OHI, H.; FUJITA, Y.; HIGUCHI, S. cDNA cloning of bradykinin- potentiating peptides-C-type natriuretic peptide precursor, and characterization of the novel peptide Leu3-blomhotin from the venom of *Agkistrodon blomhoffi*. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 13, p. 4075–4080, 2000.

NG, K. K.; VANE, J. R. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature*, v. 216 p. 762–766, 1967.

NG, K. K.; VANE J. R. Some properties of angiotensin converting enzyme in the lung in vivo. *Nature*, v. 225, p. 1142–1144, 1970.

NIKAI, T.; MOMOSE, M.; OKUMURA, Y.; OHARA, A.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H. Kallidin-Releasing Enzyme from *Bitis arietans* (Puff Adder) Venom, *Archives of Biochemistry and Biophysic*, v. 307, p. 304-310, 1993.

OHKURA, M.; MIYASHITA, Y.; NIKAI, T.; SUZUKI, J.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; OHIZUMI, Y. Properties of Ca⁺⁺ release induced by puff adder lectin, a novel lectin from the snake *Bitis arietans*, in sarcoplasmic reticulum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 277, n. 2, p. 1043-1048, 1996.

ONDETTI, M. A.; RUBIN, B.; CUSHMAN, D. W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, v. 196, p. 441-444, 1977.

ONDETTI, M. A.; WILLAMS, N. J.; SABO, E. F.; PLUSEC, J.; WEAVER, E. R.; KOCY, O. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis, *Biochemistry*, v. 10, p. 4033-4039, 1971.

PAWLAK, J.; KINI, R. M. Snake venom glutaminyl cyclase. *Toxicon*, v. 48, n. 3, p. 278-286, 2006.

RIEGER, K. J.; SAEZ-SERVENT, N.; PAPET, M. P.; WDZIECZAK-BAKALA, J.; MORGAT, J. L.; THIERRY, J.; VOELTER, W.; LENFANT, M. Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *Biochemical Journal*, v. 296, p. 373-378, 1993.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. *American Journal of Physiology*, v. 156, p. 261–273, 1949.

ROKYTA, D. R.; LEMMON, A. R.; MARGRES, M. J.; ARONOW, K. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *BioMed Central genomics*, v. 13, p. 1-23, 2012.

RUSSEAU, M.F.; MELIN, J.; BENEDICT, C. R.; AHN, S.; RAPHAEL, D.; BORNEMANN, M.; POULEUR H. Effects of disoldipine therapy on myocardial perfusion and neuro-hormonal status in patients with severe ischaemic left ventricular dysfunction. *European Heart Journal*, v. 15, n. 7, p. 957-964, 1994.

RYAN, J. W.; ROBLERO, J.; STEWART, J. M. Inactivation of bradykinin in the pulmonary circulation. *Biochemical Journal*, v. 100, n. 4, p. 795-797, 1968.

SCHMAIER, A. H. The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *Journal of Clinical Investigation*, v. 109, p. 1007–1009, 2002.

SEGURA, A.; VILLATA, M.; HERRERA, M.; LEO'N, G.; HARRISON, R.; DURFA, N.; NASIDI, A.; CALVETE, J. J.; TEHAAKSTON, R. D. G.; WARRELLI, D. A.; GUTIÉRREZ, J. M. Preclinical assessment of the efficacy of a new antivenom (EchiTAb-Plus-ICP_) for the treatment of viper envenoming in sub-Saharan Africa. *Toxicon*, v. 55, p. 369-374, 2010.

SERRANO, S. M.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C. M.; FINK, E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. *European Journal of Biochemistry*, v. 251, n. 3, p. 845–853, 1998.

SKEGGS, L. T.; DORER, F. E.; KAHN, J. R.; LENTZ, K. E.; LEVIN, M. Experimental renal hypertension: the discovery of the renin-angiotensin system. In: Soffer, R. (Ed.), *Biochemical Regulation of Blood Pressure*. Hoboken: Wiley & Sons Inc., 1981. p. 3-38.

SKEGGS, L.T. Jr, KAHN J.R., SHUMWAY N.P. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 103, p. 295–299, 1956.

SOARES, M. R.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; WERMELINGER, L. S.; ZINGALI, R. B.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; DINIZ, M. R. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. *Toxicon*, v. 46, n.1, p. 31–38, 2005.

- SOFFER, R. L. Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annual Review of Biochemistry*, v. 45, p. 73-94, 1976.
- SMITH, C. G.; VANE, J. R. The discovery of captopril. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 17 n. 8 p. 788-9, 2003.
- TASHIMA, A. K.; ZELANIS, A.; KITANO, E. S.; IANZER, D.; MELA, R. L.; RIOLI, V.; SANT'ANNA, S. S.; SCHENBERG, A. C.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. *Molecular and cellular proteomics*, v. 11, p. 1245-1262, 2012.
- VESELY, D. L. Which of the cardiac natriuretic peptides is most effective for the treatment of congestive heart failure, renal failure and cancer. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, v. 33, p. 169-176, 2006.
- YANG, H. Y. T.; ERDÖS, E. G.; LEVON, Y. A. Dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 214, p. 374-376, 1970.
- WANG, Y. M.; HUANG, K. F.; TSAI, I. H. Snake venom glutaminyl cyclases: Purification, cloning, kinetic study, recombinant expression, and comparison with the human enzyme. *Toxicon*, v. 86, p. 40-50, 2014.
- WARREL, D. A.; ORMEROD, L. D.; DAVIDSON, N. McD. Bites by puff-adder (*Bitis arietans*) in Nigeria, and value of antivenom. *British Medical Journal*. v. 4, p. 697-700, 1975.
- WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; HARISON, R.; WARREL, D. A.; WHITE, J.; WINKEL, K. D.; FOPALAKRISHNAKONE, P. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet*, v. 375 n. 9708, p. 89-91, 2010.
- WEI, L.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL, P.; CLAUSER, E. The two homologous domains of human angiotensin I- converting enzyme are both catalytically active. *The journal of biological chemistry*, V. 266, n. 14, p. 9002-9008, 1990.
- World Health Organization (a): Tropical neglected diseases. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/Savioli_presentation.pdf?ua=1>. Acesso em: 15 mai 2015.
- World Health Organization (b), Venomous snakes distribution and species risk categories. Disponível em: <<http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/>>. Acesso em: 15 mai 2015.
- World Health Organization Guidelines for the prevention and clinical management of snakebite in Africa, *Brazzaville: WHO*, 2010.
- WUSTER, W.; PEPPIN, L.; POOK, C. E.; WALKER, D. E. A nesting of vipers: Phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 49, p. 445-459, 2008.
- ZENG, X.C.; LI, W.X.; PENG, F.; ZHU, Z.H. Cloning and characterization of a novel cDNA sequence encoding the precursor of a novel venom peptide (BmKbpb) related to a bradykinin-potentiating peptide from Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Life* v. 49, n. 3, p. 207-210, 2000.

Apêndice A

Lista dos peptídeos encontrados nos pools analisados e suas respectivas massas/cargas, adquiridos pelo sequenciamento *de novo*

Organism	Sequence	ALC	m/z	z
BR	<EAMQRGPPEIPP	80	652,3245	2
BG	<EAPKPR	98	340,1982	2
BG	<EAPKPRKQ	87	468,2747	2
BA	<EHYPAPK	99	412,2083	2
BA	<EHYPAPKK	99	317,8400	3
BN	<EKAGPLPELPSM	81	674,3504	2
BN	<EKPLQPELPSMEPHE	96	920,4467	2
BA	<EKVTALPK	98	434,2674	2
BA	<ELCSDVPLK	85	493,2548	2
BA	<ELPPLQNRGP	90	551,8051	2
BA	<ELSDCEPK	95	301,4696	3
BA	<ELSDECPK	89	451,7003	2
BA	<ELSDPPPK	94	432,7265	2
BA	<ELSDPPPR	81	446,7308	2
BA	<ELSDPPSRP	80	490,2459	2
BA	<ENDFTRGDGTGGKS	84	711,8146	2
BG	<ENWPCCPPIPP	87	412,1816	3
BG	<ENWPHPQLPP	81	598,7964	2
BR	<ENWPHPQV	81	494,7334	2
BR	<ENWPHPQVPP	81	591,7882	2
BR	<ENWPHPQVPPMK	98	721,3547	2
BN	<ENWPRAPGIPPMK	88	737,8838	2
BN	<ENWPRGAIPP	85	608,3161	2
BN	<ENWPRPK	99	454,7402	2
BN	<ENWPRKIPP	82	608,3347	2
BN	<ENWPRKIPPMK	96	492,2691	3
BN	<ENWPRQIPP	75	608,3175	2
BN	<ENWPRQIPPMK	93	492,2572	3
BN	<ENWPRQIPPMK	88	737,8819	2
BG	<ENWQHCEIPP	75	412,1828	3
BR	<EPELPSMEPHE	94	687,3033	2
BA	<EPEM(+15.99)PSPM(+15.99)EPH ^a	92	647,7585	2
BA	<EPEMPSM(+15.99)EPHE ^a	92	704,2816	2
BA	<EPEQKYE	95	452,7058	2
BA	<EPEQKYEDT	84	560,7435	2
BG	<EQDLSPR	89	413,7067	2
BA	<EQKRLPKE	91	337,1981	3
BA	<EQPEQKYE	97	516,7358	2
BA	<EQRPPRP	88	431,2369	2
BA	<EQRPPRPQIPP	75	648,8609	2

BA	<EQSVPPRP	75	446,2413	2
BR	<ERGPPEIPP	85	487,2583	2
BA	<ERPPRP	97	367,2082	2
BA	<ERPPRPQIPP	85	584,8328	2
BA	<ESSQPLKK	81	300,1741	3
BG	<EWNPHQIPP	79	598,7962	2
BN	<EWPRPAPGPEIPPMK	99	561,9604	3
BR	<EWQRGPEIPPMK	78	773,8945	2
BR	<EWQRGPEIPP	88	644,3274	2
BR	<EWQRGPEIPMPK	77	516,2654	3
BR	<EWQRGPEIPP	89	644,327	2
BG	<EWQRGPEIPP	79	644,3282	2
BN	<EWRPPAPGPEIPPM(+15.99)K ^a	92	567,2904	3
BN	<EYWPRP	99	415,2029	2
BG	AKFFER	86	399,2222	2
BA	ALPKGAAKQPE	98	370,5483	3
BA	ALPKGAAKQPEQKYE	97	415,2269	4
BA	ALPKGAAKQPEQKYEDT	98	937,4837	2
BA	ALPKQAKQPEYSNLADT	83	469,2456	4
BN	ALVFVDNHDPVCV	81	714,3535	2
BA	ARLEKSVHFK	90	304,4300	4
BA	ATLPKQAKQPEQ	95	669,8707	2
BA	DEAPKM	97	345,6594	2
BA	DGKHVVF	81	401,2168	2
BA	DLRPDGKAGA	96	500,2633	2
BN	DPQCPRQLPP	76	624,3087	2
BA	DSEAHAVFK	99	502,2443	2
BA	DSVPLK	81	329,6924	2
BA	EDYSETHYSPDGKE	99	552,8948	3
BA	EELSAPR	94	401,2073	2
BA	EELSPR	99	365,6905	2
BA	EGEREPN SPL	89	564,2722	2
BA	EKFCRKQ	79	313,5011	3
BA	ELSPRAEA	84	436,7259	2
BR	EPCQRGPPELPP	84	660,3217	2
BN	EPLAPAPELPSPMEPHE	87	614,3005	3
BA	EPLHMSELPP	78	575,2783	2
BA	ESDVPLKK	99	305,8433	3
BA	ESGDLNDYEVVHPQK	93	577,2787	3
BA	ESGNLNDYEVVHPQK	98	576,9446	3
BA	ESTHYSPDGKELTVMPPVED	75	744,3540	3
BA	EVVYPQK	86	431,7323	2
BA	FDKPKT	97	368,2057	2
BG	FDTAYKLLLKNF	79	491,6124	3
BG	FLLEEEDMPPLPP	81	763,8824	2
BA	GGLSPDR	96	351,1827	2

BA	GHHLPP	84	329,1772	2
BG	GSEWRNLGSGGLRSSY	85	604,9579	3
BA	HHMFAAP	83	405,6899	2
BA	HLEKNKGLFSED	94	708,8600	2
BA	HLSKTPPPP	77	325,1909	3
BA	KGDEEPDGK	81	487,7239	2
BA	KGDELTTKPP	78	362,5323	3
BA	KGELTTKPP	91	485,7801	2
BA	KGPAAKQGKPEQKYEDT	83	625,6589	3
BN	KNCDRPPQLPPM(+15.99)K ^a	75	770,3891	2
BA	KPPVEDCCVNC	76	402,8336	3
BA	KPPVEDGMCQC	79	603,7473	2
BA	KPPVEDHM(+15.99)M(+15.99)MM ^a	83	689,2798	2
BA	KQKAKGM(+15.99)HCGGAAP ^a	76	700,3424	2
BN	KRCYAPGPPELPPMK	75	842,4371	2
BA	LAPKGAAKQPEQKYE	89	553,3011	3
BR	LDEER	99	331,161	2
BA	LKLTDSEAHAVFK	99	486,9379	3
BN	LPKPRPM(+15.99)M(+15.99)V ^a	80	550,8012	2
BN	LPTVLR	75	349,7316	2
BA	LREELSAPR	87	357,5365	3
BG	LSETVALCGR	80	524,7764	2
BN	LTAPARGLF	89	473,2776	2
BN	LTMKPVL	99	401,2487	2
BR	LTMKPVL	92	401,2481	2
BG	LVFFGNP	83	397,2127	2
BN	LVNEVETFAK	80	575,3101	2
BA	M(+15.99)PLHMSELPP ^a	83	584,2819	2
BA	MPSPM(+15.99)EPHE ^a	98	535,7183	2
BR	NEEVEEERLK	97	637,8178	2
BN	NFDLPK	98	367,1971	2
BA	NGGGGGGCQKFPSGSGGGGGGGN	75	641,2785	3
BA	NGLNDYEVVHP	93	628,8016	2
BA	NGLNDYEVVHPQK	96	504,9195	3
BA	NLEKEDEAPKM	99	435,2122	3
BG	NLLRAL	98	350,2298	2
BA	NNGLHHHYPP	77	593,2887	2
BR	NQEVEEERLK	85	637,3163	2
BA	NVLHMESLPP	75	568,7897	2
BA	PDNRESDVPLKK	88	466,5824	3
BA	PELHMTDLPP	86	575,2780	2
BA	PGHQGCPP	75	396,6761	2
BG	PPCPRPAPGM(+15.99)TLPP ^a	92	723,8600	2
BA	PPRQLPPP	79	451,2668	2
BG	QAPKPKRQ	81	318,1947	3
BN	QATKLVLELLK	77	381,5763	3

BR	QLPELPSNNEFCL	78	752,3576	2
BR	QNEVEEERLKY	85	718,8488	2
BA	RPAGRPLPP	83	529,3173	2
BA	SAGGTALR	99	417,2273	2
BA	SDSEAHAVYK	99	553,7592	2
BA	SDVPLK	99	329,6915	2
BA	SDVPLKK	99	393,7393	2
BA	SEAHAVF	97	380,6850	2
BA	SEAHAVFK	99	444,7310	2
BA	SEDYSETHYSPDGK	99	538,8895	3
BA	SEDYSETHYSPDGKE	99	581,9041	3
BA	SGGGLNDYEVVHPQK	97	533,9301	3
BA	SGLGGHM(+15.99)CGKAAGVPL ^a	77	735,8605	2
BA	SGNLNDYEVVHPQK	95	800,3904	2
BA	SKDYTETHYSPDGRE	95	595,5942	3
BA	TALPAARLATPE	84	404,2307	3
BA	TALPKGAAKQEP	98	404,2298	3
BA	TALPKGAAKQPEQK	98	489,6156	3
BA	TALPKGAVVEPQRTYE	76	440,4890	4
BA	TALPKQAKQPE	76	605,8416	2
BA	TALPKQAKQPEQKYEDT	96	659,0074	3
BA	TDSEAHAVF	90	488,7211	2
BA	TDSEAHAVFK	99	368,8488	3
BA	TDSEAHAVYK	99	374,1809	3
BA	TNSEAHAVYK	99	560,2752	2
BA	TQTNREDSVPLKK	80	505,9409	3
BA	TQTNWESDVPLKK	79	515,9344	3
BA	TSGDHHDDHHHHHHHHYH	81	433,7769	5
BN	TSLVHLF	88	408,7328	2
BA	VFKYEN	99	400,2017	2
BA	VGNTHPRP	76	439,2344	2
BA	VGTQTNWESDVPLKK	96	567,9663	3
BA	VTALPKGAAKQPE	98	437,2527	3
BA	VTLSKTPKA	96	472,7907	2
BA	VTLSKTPKAK	98	358,2294	3
BA	VTQTNWESDVPLKK	99	548,9575	3
BA	VTQTNWESDVPLKKA	99	572,6375	3
BA	VVYPQK	99	367,2151	2
BA	WESDVPLK	99	487,2527	2
BN	WYLLAFFPP	78	577,3091	2
BA	YDSETHYSPDGKE	98	764,3150	2
BA	YEVVHPQK	97	333,8461	3
BN	YFYFGK	97	412,7007	2
BN	YVRVVL	95	374,7382	2